

Postverlagsort Berlin

UNIVERSITY OF HAWAII
LIBRARY

JUN 24 '64

ARCHIV FÜR MIKROBIOLOGIE

BEGRÜNDET VON
J. BEHRENS F. BOAS A. RIPPEL

HERAUSGEGEBEN VON

H. L. JENSEN
LYNGBY

C. B. VAN NIEL
PACIFIC GROVE

R. NILSSON
UPPSALA

G. PIEKARSKI
BONN

E. G. PRINGSHEIM
GÖTTINGEN vorm. CAMBRIDGE

W. H. SCHOPFER
BERN

H. TAMIYA
TOKIO

T. WIKÉN
DELFT

UND DEN SCHRIFTFLEITERN

A. RIPPEL-BALDES
GÖTTINGEN

R. HARDER
GÖTTINGEN

30. BAND · 3. HEFT

MIT 55 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 7. AUGUST 1958)



SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

1958

Per.
QR 1
Ar 25

Archiv für Mikrobiologie

Zeitschrift für die Erforschung der pflanzlichen Mikroorganismen. Begründet 1930 von
J. Behrens, F. Boas, A. Rippel. Berlin, Springer

Das „Archiv für Mikrobiologie“ steht Originalarbeiten und Sammelreferaten aus dem Gesamtgebiet der pflanzlichen Mikroorganismen offen. Arbeiten, die nur praktischen Zwecken dienen, scheiden aus, während im übrigen alle wissenschaftlichen Fragen aus „reinen“ und „angewandten“ Gebieten berücksichtigt werden.

Das „Archiv“ erscheint nach Maßgabe des eingehenden Materials. Der Preis des Bandes beträgt DM 96,—.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20,— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 30,— für eine Arbeit. Sammelreferate werden mit DM 40,— für den Druckbogen honoriert.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophotos u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihren Arbeiten 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Manuskripte erbeten an:

Prof. Dr. *H. L. Jensen*, Lyngby/Dänemark, Statens Planteavlslaboratorium, Bakteriologisk Afdeling,

Prof. Dr. *C. B. van Niel*, California/USA, Pacific Grove, Stanford University, Hopkins Marine Station,

Prof. Dr. *R. Nilsson*, Uppsala 7/Schweden, Kungl. Lantbrukshögskolan, Mikrobiologiska Institutionen,

Prof. Dr. *G. Piekarski*, Bonn/Rh., Venusberg, Hygienisches Institut, medizinisch-parasitologische Abteilung, der Universität,

Prof. Dr. *E. G. Pringsheim*, Göttingen, Untere Karspüle, Pflanzenphysiologisches Institut

Prof. Dr. *W. H. Schopfer*, Bern/Schweiz, Botanisches Institut der Universität,

Prof. Dr. *H. Tamiya*, Tokio/Japan, 41, Mejiro-Machi 4th St., The Tokugawa Institute for Biological Research,

Prof. Dr. *T. Wikén*, Delft/Holland, Julianalaan 67 A, Laboratorium voor Microbiologie Technische Hogeschool

oder an die

Schriftleitung:

Prof. Dr. *A. Rippel-Baldes*, Göttingen, Albrechtstraße 6,

Prof. Dr. *R. Harder*, Göttingen, Pflanzenphysiolog. Institut, Untere Karspüle 2

Springer-Verlag

Berlin · Göttingen · Heidelberg

30. Band

Inhaltsverzeichnis

	3. Heft Seite
MÖNCH, G., Untersuchungen über die physiologische und morphologische Wirkung von Kupfer auf <i>Mucor adventitius</i> var. <i>aurantiacus</i> . Mit 20 Textabbildungen	231
LINDEMANN, G., Untersuchungen zur Verbreitung und Systematik der Mortierellen. Mit 3 Textabbildungen.	256
GUTTENBERG, H. v., u. H. SCHMOLLER, Kulturversuche mit <i>Peronospora brassicae</i> Gäum. Mit 11 Textabbildungen	268
NILSSON, P. E., Silage Studies VIII. Preparation of Microbe-free Silage. With 3 Figures in the Text	280
TOLLE, R., Untersuchungen über die Pseudomycorrhiza von Gramineen. Mit 8 Textabbildungen	285
PAUL, H. L., Spektralphotometrische Untersuchungen am Tabakmosaik-Virus. Mit 6 Textabbildungen	304
TEMPERLI, A., Über die Oxydation einiger organischer Säuren durch <i>Micrococcus rubens</i> . Mit 4 Textabbildungen	318

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Untersuchungen über die physiologische und morphologische Wirkung von Kupfer auf *Mucor adventitius* var. *aurantiacus**

Von

GERTRAUD MÖNCH

Mit 20 Textabbildungen

(Eingegangen am 13. Februar 1958)

Obwohl heute eine Vielzahl von Arbeiten über Spurenelemente vorliegt, ist der Einfluß von Kupfer auf Phycomyceten nur wenig untersucht worden (LANGE DE LA CAMP u. STEINMANN 1953). Ausgehend von den Untersuchungen von RITTER (1955), der in der alkalischen Autolyse von *Mucor adventitius* das Verschwinden der Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Dopa und gleichzeitig eine gelbbraune Anfärbung von Mycel und Nährlösung beobachtete, sollte zuerst nachgeprüft werden, ob *Mucor* eine Phenoloxydase besitzt, die die verschwindenden Aminosäuren zu melaninartigen Farbstoffen oxydiert oder welcher Art der gebildete Farbstoff sei. Diese Frage interessierte um so mehr, als andere Phycomyceten zwar gefärbte Sporen besitzen, eine Anfärbung von Mycel oder Nährlösung aber sonst nicht auftritt. Da keine Phenolase nachgewiesen werden konnte, trat die Frage auf, inwieweit der Pilz Kupfer für sein Wachstum benötigt. Da sich hierbei eine große Empfindlichkeit bereits gegenüber Kupferkonzentrationen von 55γ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O/l}$ zeigte, wurden Versuche über die Schwermetallverträglichkeit und die Stoffwechselbeeinflussung durchgeführt. Neben ionalem Kupfer wurden zwei Kupferaminosäurekomplexe verwendet. Außer der physiologischen Kupferwirkung wurde auch die morphologische untersucht und versucht, Kupfer histochemisch nachzuweisen und die Speicherung bei hoher Schwermetallkonzentration näher zu lokalisieren.

Methodik

Nährböden und Beimpfung: Als fester Nährboden wurde ein Malz-Zucker-Pepton-Agar nach LANGE DE LA CAMP u. STEINMANN (1953) verwendet. Kupferzusätze: 0,1 g (pH 5,6); 0,2 g (pH 5,6); 0,3 g (pH 5,4); 0,4 g (pH 5,4); 0,5 g (pH 5,2); 1 g (pH 5,2) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O/l}$ und 0,1 g; 0,5; 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O/l}$ äquivalente Menge Cu-glycinat . Schüttel- und Ruhekulturen wuchsen in physiologisch saurem und physiologisch alkalischem Nährmedium nach BEHR (1930). Die in steriler Nährlösung

* Auszug aus der gleichlautenden Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen 1957.

gelösten Kupferverbindungen wurden vor dem Beimpfen zupipettiert. Impfmateriel für Ruhekulturen waren die von einer 3 Tage alten Myceldecke in Würze abgeschnürten Kugelhefen, die ein Magnetrührer gleichmäßig verteilte. Als Impfmateriel für Schüttelkulturen diente eine 12 Std alte Schüttelkultur in physiologisch alkalischem Nährmedium. Zu diesem Zeitpunkt waren die eingeimpften Sporen ausgekeimt, sie wurden durch einen Magnetrührer gleichmäßig verteilt.

Die Herstellung eines kupferverarmten Nährbodens erfolgte durch Extraktion mit Dithizon. Dazu wurden die Salze und die Glucose in der Hälfte des Endvolumens aqua bidest. gelöst, auf pH 2,8 angesäuert und dreimal im Schütteltrichter mit Dithizon (gelöst in Tetra) extrahiert. Danach wurde das auf gleiche Weise verarmte restliche aqua bidest. zugegeben und dreimal mit reinem Tetra nachgewaschen. Zur Einstellung des pH -Wertes auf pH 3,2 diente in kupferverarmter Nährlösung gelöste NaOH p. a. Impfmateriel waren die von einer 3 Tage alten Myceldecke abgeschnürten Kugelzellen. Zum Waschen war physiologische Kochsalzlösung auf pH 2,8 angesäuert und wie beschrieben verarmt, danach der pH -Wert auf pH 6,0 eingestellt worden. Mit dieser Kochsalzlösung wurden die abzentrifugierten Kugelzellen dreimal gewaschen. Das *Aspergillus*-Mycel für die Kontrolle wurde genau so behandelt. Das Einschleppen einer gewissen Kupfermenge durch die Zellen konnte nicht verhindert werden, da sie auf kupferhaltigem Nährboden gewachsen waren. Nach WOLFF u. EMMERLIE (1930) benötigt *Aspergillus niger* $0,1 \gamma$ Cu/90 cm^3 Nährlösung, um nach 9 Tagen vereinzelte gelbe und später einige braune Conidien zu bilden. Da *Aspergillus* auf der verwendeten Nährlösung gelbe Conidien bildete, kann für deren Kupfergehalt ungefähr $1 \gamma/l$ angenommen werden; die durch das Impfmateriel eingeschleppte Schwermetallmenge ist hierbei mit einberechnet. Vor der Zugabe höherer Kupferdosen wurde der Pilz erst 5 Tage auf verarmtem Nährboden kultiviert, um ein kupferärmeres Mycel zu besitzen. $0,55 \gamma$; $5,5 \gamma$ und 55γ $CuSO_4 \cdot 5H_2O/l$ und $5,5 \gamma$; 55γ dem Kupfergehalt von $CuSO_4 \cdot 5H_2O/l$ äquivalentes Cu-glycinat wurden in kupferverarmter Nährlösung gelöst zupipettiert. Anaerobe Kultivierung erfolgte nach der von SCHMIDT-LORENZ (1956) beschriebenen Anaerobentechnik. Alle Pilzkulturen wuchsen bei $25^\circ C$.

Allgemeine chemische Methoden: Zur Trockengewichtsbestimmung wurde das Mycel über einem Membranfilter abgesaugt, mit aqua dest. gewaschen, als Film vom Filter abgezogen und in einem Wägegläschen nach 24 Std Trocknung bei $75^\circ C$ gewogen. In der Nährlösung wurde der Anfangs- und End- pH -Wert und der Zuckergehalt nach der Methode SCHOORL-MARQUENNE-LEHMANN (BERNHAEUER 1939) titrimetrisch bestimmt. Atmungsmessungen erfolgten in der Warburg-Apparatur nach der \pm KOH-Methode. Hauptraum: $3 cm^3$ bewachsene Nährlösung; Einsatz: $0,3 cm^3$ KOH oder aqua dest. Aus den bewachsenen Kölbchen wurde Nährlösung abpipettiert, der Gasaustausch über 20 min bestimmt, das Mycel abgesaugt, getrocknet, gewogen und der Gasaustausch auf 10 mg Trockenmycelgewicht umgerechnet. Zur Bestimmung der Cytochrombanden wurde das Mycel abzentrifugiert, dreimal mit Phosphatpuffer (pH 7,2) gewaschen, zwischen Filterpapier ausgepreßt und mit einem Spatel in eine Kuvette gedrückt. Geringere Myceldichte ergab keine scharfen Banden. Zur Messung diente ein Handspektroskop. Reduziert wurde mit Natriumdithionit. Carotinoidisolierung erfolgte durch Kaltextraktion nach WITTMANN (1957). Cu-glycinat wurde nach HEYKE (1954) hergestellt.

Fermentchemische Methoden: Kartoffelphenolase wurde nach der von HERRMANN (1954) beschriebenen vereinfachten Methode nach KUBOWITZ dargestellt. Die Aktivitätsmessung des Fermentes aus den Fruchtkörpern von *Coprinus lagopus* erfolgte direkt im Homogenat. Homogenisiert wurde im eisgekühlten Homogenisator mit max. 40000 U/min mit eisgekühltem Phosphatpuffer (pH 6,8), dreimal 5 min. Es wurde versucht, aus dem homogenisierten Mycel von *Mucor adventitius* durch frak-

tionierte Aceton-, Ammonsulfat- und Alkoholfällungen bei 0° ein phenoloxydierendes Fermentsystem zu isolieren. Zur papierelektrophoretischen Trennung wurde die von WALLENFELS u. PECHMANN (1951) für die Trennung von Amylase, Proteinase, Lipase und Phosphatase aus Pilzextrakten beschriebene Methode auf Phenoloxydase angewandt. Die bei der fermentativen Oxydation von Phenolen auftretenden Oxydationsprodukte konnten nach HERRMANN (1955) papierchromatographisch nachgewiesen werden. Die Fermentaktivität wurde manometrisch in der Warburg-Apparatur gemessen. Hauptraum: 3 cm³ m/100 Substratlösung; Einsatz: 0,2 cm³ 10% NaOH; Ansatz: 0,3 ccm Fermentlösung bei Verwendung gereinigter Fermentpräparate; bei der Verwendung von Homogenaten, Hauptraum: 3 cm³ Homogenat; Ansatz: 0,3 cm³ m/10 Substratlösung.

Färbemethoden: Kupferfärbung mit Rubeanwasserstoffsäure nach OKAMOTO u. UTAMURA (1936). Rubeanwasserstoffsäure gibt mit Cu⁺⁺ einen grünen, mit komplexgebundenem Kupfer wie Cu-glycinat und Na₂(Glu-Cu-Glu¹) einen braunen Niederschlag. Der Cu-Rubeanwasserstoffsäurekomplex ist etwas lipoidlöslich, es konnte aber bei den später angeführten Beispielen die Übereinstimmung zwischen Ort der Kupferspeicherung und der Kupferfärbung nachgewiesen werden. Kupferfärbung mit Hämatoxylin nach GLICK (1949). Fällung von Schwermetallen mit H₂S-gesättigtem Alkohol nach TIMM (ROMEIS 1948). Fettfärbung mit Sudanschwarz, Scharlachrot und Sudan III.

Ergebnisse

I. Versuche über die Isolierung einer Phenolase aus *Mucor adventitius*

Phenoloxydierende Fermentsysteme sind bei Pflanzen und Mikroorganismen weitverbreitet. Bei Asco- und Basidiomyceten sind Phenolasen häufig nachgewiesen und zuerst von KEILIN u. MANN (1940) bei *Psalliota campestris* kristallin gewonnen worden. BRÜCKER (1955; 1956; 1957) konnte Phenole in *Phycomyceten* nachweisen, über das Vorkommen von Phenolasen bei dieser Pilzgruppe ist nichts bekannt.

Als Vorversuch zum Phenolasenachweis wurde der von KÜSTER (1953/1954) angegebene Plattentest mit *Mucor adventitius*, *M. flavus* + und —, *M. janssenii*, *M. ramannianus* und *M. racemosus* durchgeführt. Nach 24 Std Bebrütung bei 28° C konnten die von KÜSTER bei *Azotobacter* durch Phlobaphenbildung auftretenden Ränder nicht nachgewiesen werden. Mycelien aus physiologisch alkalischer, physiologisch saurer und Nährlösung mit Tyrosin als N-Quelle wurden homogenisiert und das Homogenat und die bei den Isolierungsmethoden auftretenden Fraktionen auf ihre Fermentaktivität gegenüber Brenzcatechin in der Warburg-Apparatur untersucht. Sofort nach der Zugabe des Phenols trat eine intensive rot-violette Färbung auf, der gebildete Farbstoff hatte ganz andere Absorptionsmaxima als die Oxydationsprodukte der Kartoffelphenolase. Eine Änderung des Gasvolumens konnte nicht gemessen werden. Nach KÜSTER (1953/1954) beruht die bei *Streptomyces* gefundene mangelnde Nachweisbarkeit einer Phenolase auf der Schwierigkeit, das Ferment vom Organeiweiß zu trennen. Es wurde

¹ Glu = Glutaminsäure.

daher versucht, ein Ferment papierelektrophoretisch zu isolieren. Als Parallele gelaufene Kartoffelphenolase war nach 19 Std in einer $1\frac{1}{2}$ cm breiten Zone 2 cm zur Anode gewandert. Die als Indikatoren verwendeten 10% Brenzcatechinelösung (Braunfärbung durch Oxydation) und Ninhydrin (Rotfärbung) ergaben eine übereinstimmende Färbung. Bei dem *Mucor*-Präparat konnte keine einer Phenolase entsprechende Zone nachgewiesen werden.

Versuche, ein Zwischenprodukt der fermentativen Pyrogalloloxydation papierchromatographisch nachzuweisen, gelangen bei *Mucor*-Präparaten im Gegensatz zur Kartoffelphenolase nicht.

In Anlehnung an die Versuche von HOROWITZ u. SAN-CHIUN-SHEN (1952) wurde *Mucor* auf S-Mangelnährlösung kultiviert. Beide Autoren fanden bei *Neurospora sitophila* keine Tyrosinaseaktivität bei Zugabe von 0,5 g $MgSO_4/l$, dagegen hohe Fermentaktivität, wenn statt dessen 0,00785 g $MgSO_4$ und 0,4 g $MgCl_2$ gegeben wurde.

Bei *Mucor adventitius* konnte auch unter derartigen Bedingungen keine Phenolase nachgewiesen werden.

Um neben der Kartoffelphenolase ein mikrobielles Ferment zum Vergleich zu besitzen, wurde eine Phenolase aus den Fruchtkörpern von *Coprinus lagopus* untersucht. Sie zeigte in ihrer Aktivität gegenüber verschiedenen Phenolen Ähnlichkeit mit dem von LINDBERG u. HOLM (1952) beschriebenen Ferment aus *Clavaria ligula*. *Coprinusphenolase* ist nach der von den beiden Autoren angegebenen Einteilung der Phenolasen als Laccase zu bezeichnen.

Da vor allem bei den manometrischen Versuchen, aber auch weder papierelektrophoretisch noch papierchromatographisch ein phenoloxydierendes Fermentsystem nachgewiesen werden konnte, kann angenommen werden, daß *Mucor adventitius* keine Phenolase besitzt.

Nach dem negativen Phenolasenachweis war der in der Autolyse von *Mucor adventitius* gebildete Farbstoff nicht auf die Wirkung eines derartigen Fermentes zurückzuführen. Es sollte daher die Natur des Farbstoffes bestimmt werden.

II. Carotinoidnachweis

RITTER (1955) beobachtete bei der Chromatographie der freien Aminosäuren aus *Mucor adventitius* einen wie Glucosamin wandernden gelben Fleck. Der Farbstoff, der sich bei alkoholischer Extraktion des Mycels herauslöste, wurde von ihm als Carotinoid angesprochen.

Der aus *Mucor*-Würzekulturen nach WITTMANN (1957) isolierte Farbstoff war in Aceton, Petroläther usw. mit intensiv gelber Farbe löslich. Die Carotinoidnatur wurde nach KARRER u. JUCKER (1948) mit Carr-Price-Reagenz, Säurereaktion und Verteilungsprobe nachgewiesen. Das wahrscheinlich vorliegende Farbstoffgemisch säulenchromatographisch nach WITTMANN (1957) zu trennen, gelang nicht. Auch Versuche einer ringchromatographischen Trennung nach WITTMANN (1957) gelangen nicht. Der Mucorfarbstoff wanderte kurz hinter der Lösungsmittelfront. Handspektroskopisch wurden in Chloroform zwei Banden bei 455–65 $m\mu$ und 480 $m\mu$ gemessen.

Bei dem von *Mucor* gebildeten Farbstoff handelt es sich um ein Carotinoid.

III. Einfluß von Kupfer auf das Wachstum und den Stoffwechsel von *Mucor advertitius*

A. Wachstumsversuche

1. Wachstum in kupferverarmter physiologisch alkalischer Nährlösung

Bei einer Kupferkonzentration von ungefähr $1 \gamma \text{ Cu}^{++}/\text{l}$ wuchs der Pilz gut, auch nach geringfügiger Konzentrationserhöhung durch Zugabe von $0,55 \gamma$ und $5,5 \gamma \text{ CuSO}_4/\text{l}$. Erst nach Zugabe von $55 \gamma \text{ CuSO}_4/\text{l}$, welches dem Kupfergehalt nach Zugabe der Hoaglandspurenelementlösung entspricht, trat eine geringe Hemmung auf (siehe Abb. 1). Die in aqua dest. (über eine Kupferapparatur destilliert) mit Hoaglandlösung und somit unter gleichen Bedingungen wie bei den Versuchen mit hohen Kupferdosen gezogene Kontrolle zeigte eine deutliche Hemmung. Aus den Versuchen geht jedenfalls hervor, daß *Mucor advertitius* Kupfer, wenn überhaupt, so in sehr viel niedrigerer Konzentration benötigt als etwa *Aspergillus niger*.

In so niedrigen Konzentrationen wirkte Cu-glycinat etwas stärker hemmend als CuSO_4 (siehe Abb. 2). Die bei Kupfergabe auftretenden Erhöhungen des pH-Wertes wurden auch von MULDER (1939) bei *Aspergillus niger* beobachtet. Der andersartige Verlauf der pH-Kurve der Kontrolle ist durch das etwas stärkere Absinken des pH-Wertes zu Wach-

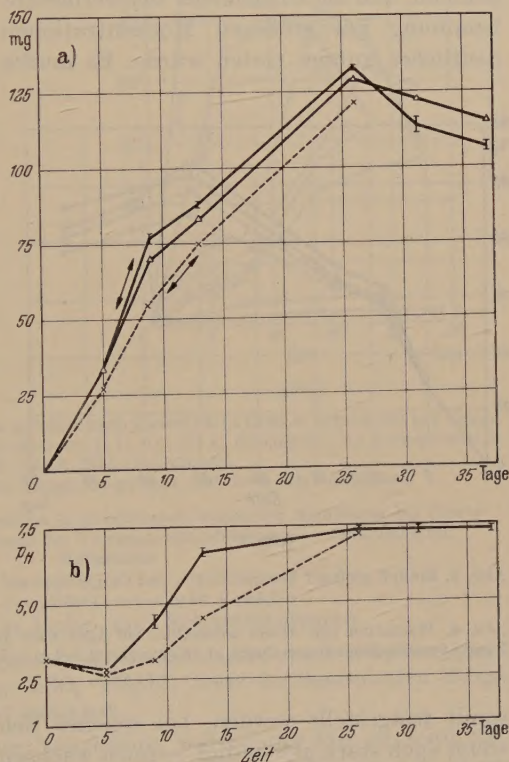


Abb. 1.

Wachstum von *Mucor advertitius* auf kupferverarmtem Nährboden mit Zusatz geringer Dosen $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.
 a) Trockenmycelgewicht. I kupferverarmt; $0,55 \gamma$ und $5,5 \gamma \text{ CuSO}_4$; Δ $55 \gamma \text{ CuSO}_4$; \times Kontrolle (----).
 b) pH-Werte. I kupferverarmt; $0,55 \gamma$; $5,5 \gamma$ und $55 \gamma \text{ CuSO}_4$; \times Kontrolle (----). \longleftrightarrow Restglucose verbraucht

tumsbeginn teilweise zu erklären. Trotz dem schlechteren Wachstum betrug der ökonomische Koeffizient der Kontrolle am 5. Kulturtag 8,2 und am 9. Tag 7,4, während der der kupferverarmten Kultur nur

6,3 am 5. Kulturtage betrug. Auf kupferverarmtem Nährboden bildete *Mucor* reichlich Luftmycel und Sporangien. Bei Cu-glycinatzugabe trat Luftmycelbildung erst am 13. Kulturtage auf, auf kupferverarmtem Nährboden schon am 8. Tag.

Da es sich gezeigt hatte, daß *Mucor adventitius* zu seinem Wachstum Kupferkonzentrationen unter 1 γ /l benötigte, dagegen aber eine große Empfindlichkeit gegenüber erhöhten Kupferkonzentrationen zeigte, sollte die Ursache der Kupferhemmung näher untersucht werden. Es war anzunehmen, daß die Ursache der Schwermetallhemmung bei größeren Konzentrationen deutlicher zutage treten würde. Es mußte

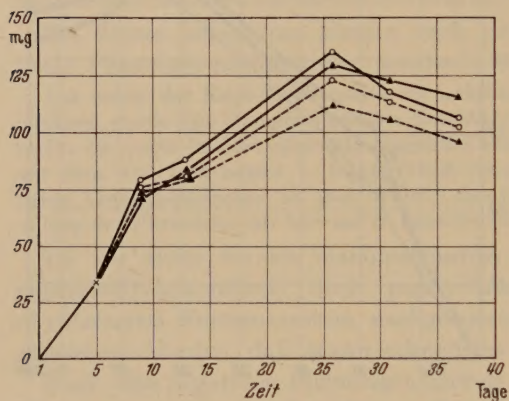


Abb. 2

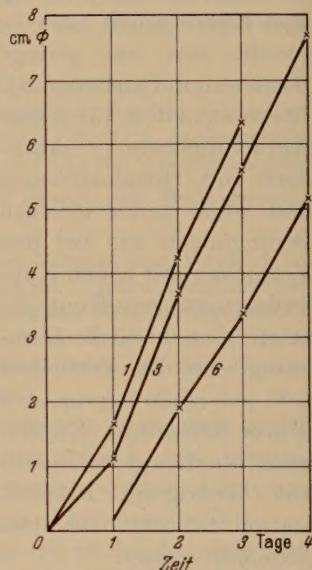


Abb. 3

Abb. 2. Einfluß geringer Mengen CuSO₄ und Cu-glycinat auf das Wachstum von *Mucor adventitius*.
○ 5,5 γ, ▲ 55 γ, — CuSO₄, ---- Cu-glycinat

Abb. 3. Wachstum von *Mucor adventitius* auf Agar nach LANGE DE LA CAMP u. STEINMANN mit Zusatz verschiedener Dosen CuSO₄. 1. Kontrolle; 2. 0,2 g; 3. 0,2 g; 4. 0,3 g; 5. 0,4 g; 6. 0,5 g CuSO₄/l

somit festgestellt werden, bei welcher Schwermetalldosis der Pilz — wenn auch stark geschädigt — noch wachsen konnte.

2. Wachstum auf Agar

Mucor adventitius wurde auf dem von LANGE DE LA CAMP u. STEINMANN (1953) bei Untersuchungen über die Schwermetallverträglichkeit von *Mucor racemosus* verwandten Agar mit Zugabe von 0,1 g; 0,2 g; 0,3 g; 0,4 g; 0,5 g und 1 g CuSO₄ · 5H₂O/l kultiviert. Der Pilz wuchs in Petrischalen; es wurde der Koloniedurchmesser bestimmt (Abb. 3).

Bei Zugabe von 1 g CuSO₄ bildete *Mucor* nur winzige knötchenartige Kolonien, die stark gelb gefärbt waren, kein Luftmycel bildeten und

deren Hyphen wie später beschrieben stark morphologisch verändert waren. Bei den niedrigeren Kupferkonzentrationen trat außer der Wachstumshemmung kein Unterschied zur Kontrolle auf. Ferner wurde dem Agar Cu-glycinat zugegeben, wobei aber fraglich ist, ob das Kupfer noch am Glykokoll oder an stärker komplexbildende Aminosäuren des Peptons gebunden vorliegt. Die 1 g CuSO_4 äquivalente Menge Cu-glycinat wurde ohne Veränderungen getragen (Wachstum siehe Abb. 4).

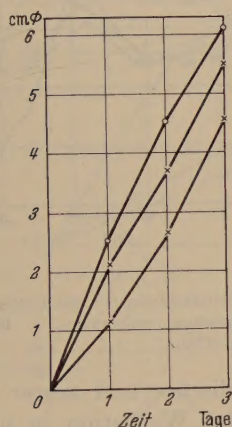


Abb. 4

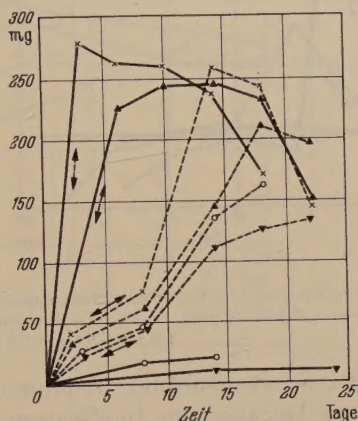


Abb. 5

Abb. 4. Wachstum von *Mucor adventitius* auf Agar nach LANGE DE LA CAMP u. STEINMANN mit Zusatz verschiedener Mengen Glykokoll und Cu-glycinat. 1. 1; 0,5; 0,1 g Glykokoll/l; 0,1 g Cu-glycinat/l. 2. 0,5; 2. 0,5; 3. 1,0 g Cu-glycinat/l

Werte 1 g CuSO_4 äquivalente Menge Cu-glycinat und deren Glykokollgehalt

Abb. 5. Wachstum von *Mucor adventitius* in physiologisch alkalischer Nährlösung bei Zusatz verschiedener Mengen CuSO_4 . Verlauf der Trockengewichtsbildung, — Schüttelkultur, ---- Ruhekultur

3. Wachstum von Ruhe- und Schüttelkulturen

Mucor adventitius wurde in physiologisch alkalischer und saurer Nährlösung mit Zusatz von 0,1 g; 0,5 g und 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{l}$, sowie der äquivalenten Menge Cu-glycinat und $\text{Na}_2(\text{Glu-Cu-Glu})$ kultiviert.

In physiologisch alkalischer Nährlösung wächst der Pilz in Schüttelkultur schneller als in Ruhekultur (Abb. 5). Die Kupferverträglichkeit von Ruhe- und Schüttelkulturen zeigte signifikante Unterschiede. Während in Ruhekultur nur eine Wachstumsverzögerung auftritt und 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ noch getragen wird, zeigte sich bei später durchgeführten Parallelansätzen mit Schüttelkulturen, daß bereits 0,2 g CuSO_4 jegliches Wachstum unterband. Die erträgliche Grenzkonzentration beträgt somit nur wenig mehr als 0,1 g. Die pH-Werte liefen den Werten des Trockenmycelgewichtes annähernd parallel. In der Zunahme an Trockengewicht je Tag zeigte sich bei den Ruhekulturen eine

verstärkte Zunahme bei Wachstumsbeginn und vor Einsetzen der Autolyse (Abb. 6). Die Ruhekulturen rochen intensiv nach Fruchtäthern und waren stark grün gefärbt.

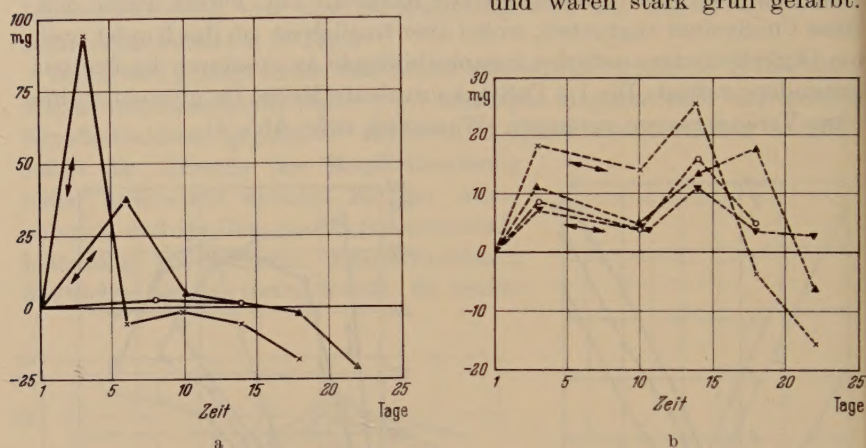


Abb. 6. Wie Abb. 5. a Trockengewichtszunahme je Tag der Schüttelkulturen; b der Ruhekulturen, — Schüttelkultur, - - - - - Ruhekultur, \longleftrightarrow Restglucose verbraucht. \times Kontrolle, \blacktriangle 0,1 g CuSO_4 , \circ 0,5 g CuSO_4 , \triangle 1 g CuSO_4

Bei Schüttelkulturen in physiologisch alkalischer und saurer Nährlösung bei gleichem Impfmateriell verläuft das Wachstum in physiologisch saurer Nährlösung wesentlich langsamer; das Maximum wird erst am 13. Tag erreicht (Abb. 5 und 7). Gaben von 0,5 und 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ verhinderten jegliches Wachstum, bei 0,1 g war die Hemmung wesentlich stärker als bei der gleichen Schwermetallkonzentration in physiologisch alkalischer Nährlösung. Das

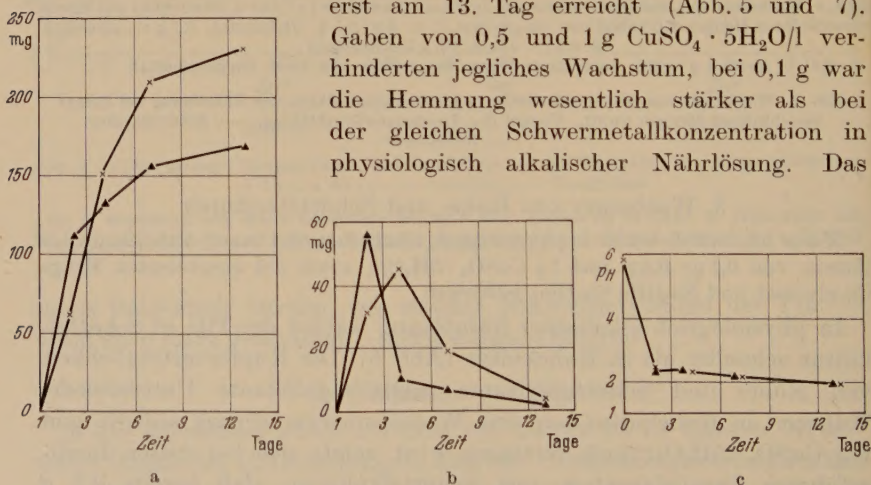


Abb. 7. Wachstum von *Mucor advertitius* in Schüttelkultur in physiologisch saurer Nährlösung. a Trockenmycelgewicht, b Trockengewichtszunahme je Tag, c pH-Werte, \times Kontrolle, \blacktriangle 0,1 g CuSO_4/l

höhere Mycelgewicht der Cu-Kultur am 2. Kulturtag kann nicht erklärt werden. Die pH-Werte von Kontrolle und Cu-Kultur waren gleich hoch.

Ruhekulturen in physiologisch saurer Nährlösung (Abb. 8) wuchsen wesentlich schneller als die mit gleicher Impfmenge gezogene Kontrolle in physiologisch alkalischer Nährlösung. Die Kupferempfindlichkeit war größer als in physiologisch alkalischer Nährlösung, da bei 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ kein Wachstum mehr auftrat. Bei 0,5 g wuchsen nur

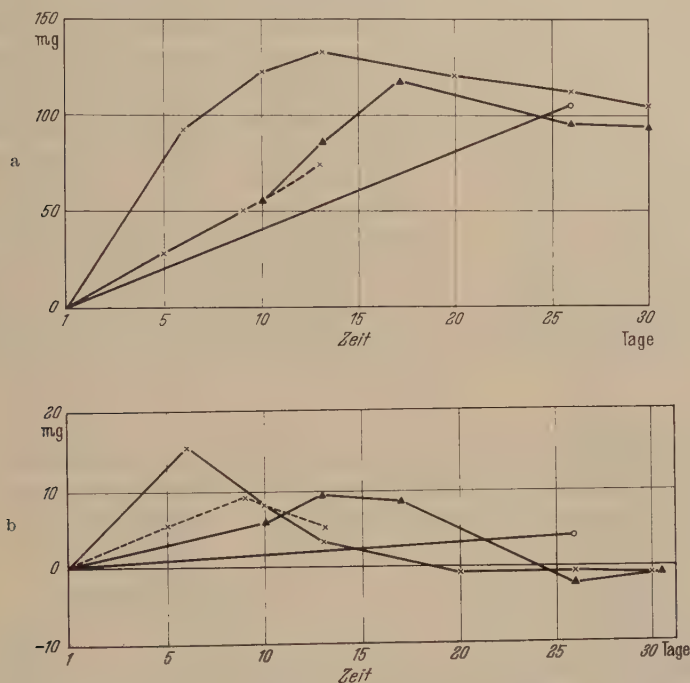


Abb. 8. Wachstum von *Mucor adventitius* in Ruhekultur in physiologisch saurer Nährlösung. a Trockenmycelgewicht, b Trockengewichtszunahme je Tag, × Kontrolle (—), ▲ 0,1 g CuSO_4/l , o 0,5 g CuSO_4/l , × Kontrolle (---) phys. alkalisch

einige wenige Kulturen, sie wiesen nicht den fruchtartigen Geruch und die Grünfärbung der stark kupferhaltigen Ruhekulturen in physiologisch alkalischer Nährlösung auf.

In den Schüttelkulturen mit Zusatz von CuSO_4 , Cu-glycinat und $\text{Na}_2(\text{Glu-Cu-Glu})$ wirkten die Kupferamino-säurekomplexe in physiologisch alkalischer Nährlösung weniger toxisch als ionales Kupfer (Abb. 9). Bei Cu-glutamat war das erreichte Trockenmycelgewicht größer, die Hemmung zu Wachstumsbeginn aber genauso groß wie bei Cu-glycinat. In physiologisch saurer Nährlösung (Abb. 10) trat in den ersten Tagen eine Wachstumshemmung auf; der pH-Wert der Cu-glycinatkultur sank tiefer als der der Kontrolle. Den Kontrollen wurden äquivalente Mengen Aminosäure zugegeben.

Versuche, Ruhekulturen von *Mucor adventitius* durch monatelange Kultivierung in physiologisch alkalischer Nährlösung an höhere Kupferdosen zu adaptieren, gelangen nicht. Das Verhältnis zwischen Wachstum auf normaler Nährlösung und bei Zusatz von 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ blieb

immer annähernd gleich. Es wurde alle drei Wochen umgeimpft. Obwohl der Pilz in Kupferkulturen auf Grund der geringen Impfmenge kein Luftmycel bildete, ging seine Fähigkeit, in normaler Nährlösung Luftmycel und Sporangien zu bilden, nicht verloren. Während der monatelangen Kultivierung bekam der Pilz durch starke Kupferspeicherung ein intensiv grünes Aussehen, das aber bereits nach 24 Std Kultivierung in normaler Nährlösung verschwand.

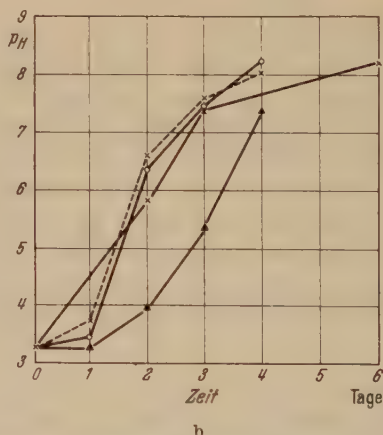
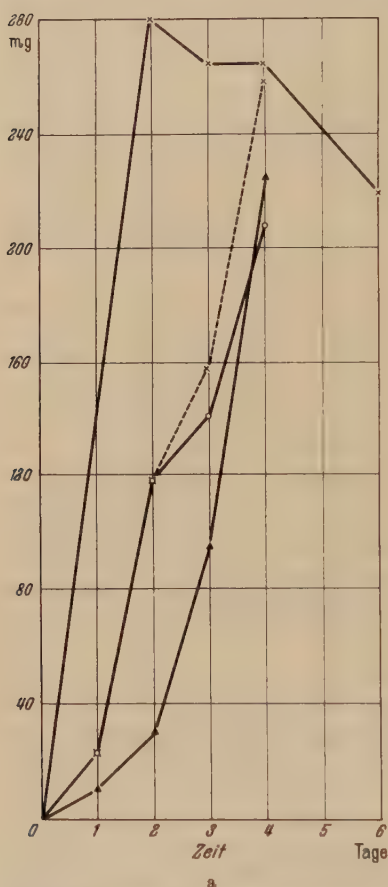


Abb. 9. Wachstum von *Mucor adventitius* in physiologisch alkalischer Nährlösung mit Zusatz von CuSO_4 , Cu-glycinat und Na_2 (Glu-Cu-Glu). a) Trockenmycelgewicht, b) pH-Werte, × Kontrolle —, × 0,1 g Na_2 (Glu-Cu-Glu), ▲ 0,1 g CuSO_4 , ○ 0,1 g Cu-glycinat

Bei der vergleichenden Betrachtung der Wachstumskurven war u. a. folgendes auffallend: a) Die Unterschiede in den Wachstumsgeschwindigkeiten von Ruhe- und Schüttelkulturen in physiologisch alkalischer und saurer Nährlösung. b) Die geringe Mycelausbeute von Ruhekulturen in physiologisch saurer Nährlösung. c) Der große Unterschied in der Kupferverträglichkeit von Schüttel- und Ruhekulturen. Zur Klärung der letzten beiden Fragen wurden folgende Versuche durchgeführt:

4. Wachstum mit Glycerin als C-Quelle

Bei Wachstum von *Mucor advertitius* in Ruhekultur in physiologisch saurer Nährlösung war das maximale Trockengewicht wesentlich niedriger als in physiologisch alkalischer Nährlösung. RITTER (1955) fand ein Trockengewicht von 233,7 mg je 100 cm³ physiologisch saurer Nährlösung und 416,9/100 cm³ physiologisch alkalischer Nährlösung. In der von BROWN (1950) zitierten Arbeit von HAGEN (1910) wird angegeben, daß *Mucor griseocyaneus*, *M. racemosus*, *M. kristianicus*, *M. spinosus* und *M. sphaerosporus* Nitrat und Ammoniakstickstoff zwar in Gegenwart von Glucose ausnützen können, bei Verwendung von Glycerin als C-Quelle aber nur Nitrat.

Es sollte geprüft werden, ob hiermit die geringe Mycelausbeute in physiologisch saurer Nährlösung zu erklären sei. Es wurde mit Glycerin und Glycerinphosphorsäure als C-Quelle in physiologisch saurer und alkalischer Nährlösung in Ruhe- und Schüttelkultur gezogen, es trat aber kein Wachstum auf (Tab. 1). Um nachzuweisen, daß das fehlende Wachstum mit Glycerin durch die Art der Stickstoffquelle bedingt sei, wurde Aminosäurestickstoff in KNO₃ äquivalenter Menge angeboten (Tab. 2). Gut ausgenutzt wurden Tyrosin, Pepton und Glutaminsäure.

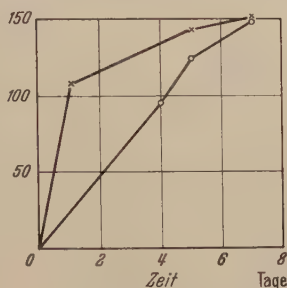


Abb. 10. Wachstum von *Mucor advertitius* in Schüttelkultur in physiologisch saurer Nährlösung. Kontr. (Glykokoll) 0,1 g Cu-glycinat/l (vgl. Abb. 9)

Tabelle 1. Wachstum von *Mucor adv.* auf Glycerin als C-Quelle

Kultur- bedingung	C-Quelle	N-Quelle	Alter (Tage)	Trockenmycel- gewicht ¹	pH	
					A.	E.
Ruhe	Glycerin	KNO ₃	3	5,4	3,2	3,25
			14	6,9	3,2	3,55
Ruhe	Glucose	KNO ₃	3	21,4	3,2	5,6
			14	58,3	3,2	6,55
Schüttel	Glycerin	KNO ₃	3	3,8	3,2	3,35
			10	3,55	3,2	3,4
Schüttel	Glucose	KNO ₃	3	204,25	3,2	7,3
Ruhe	Glycerin	(NH ₄) ₂ HPO ₄	3	5,6	5,8	2,7
			10	6,3	5,8	2,7
Ruhe	Glucose	(NH ₄) ₂ HPO ₄	3	77,15	5,8	2,7
Schüttel	Glycerin	(NH ₄) ₂ HPO ₄	3	2,8	5,8	2,75
			10	6,3	5,8	2,75
Schüttel	Glucose	(NH ₄) ₂ HPO ₄	3	187,1	5,8	2,3

¹ in Milligramm je 50 cm³ Nährlösung, Einsaatmenge 4,8 mg.

Da mit Glycerin als C-Quelle weder mit KNO_3 noch mit Ammoniakstickstoff Wachstum auftrat, konnte hiermit die geringe Mycelausbeute auf physiologisch saurem Nährboden nicht erklärt werden.

Tabelle 2. Wachstum von *Mucor adv.* auf Glycerin als C-Quelle und verschiedenen Aminosäuren als N-Quelle

C-Quelle	N-Quelle	Alter Tage	Ausgangs-pH	End-pH	Trockenmycelgewicht ¹
Glycerin	Harnstoff	2	5,8	6,9	33,25
		5		6,7	19,4
Glycerin	Glykokoll	2	5,8	7,2	30,4
		5		8,3	50,1
Glycerin	Glutaminsäure	2	5,8	7,9	80,8
		5		8,0	124,5
Glycerin	Tyrosin	2	5,8	6,0	233,3
		5		6,25	254,3
Glycerin	Methionin	2	5,8	6,1	23,75
		5		5,8	24,2
Glycerin	Pepton	2	5,8	7,35	155,3
		5		7,7	262,5
Glycerin	KNO_3	2	3,2	5,5	2,2
		5		5,5	4,3
Glucose	KNO_3	2	3,2	7,45	258,5
		5		7,4	248,0
Glucose	$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	2	5,8	2,3	237,7
		5			

¹ in mg je 50 cm³ Nährlösung, gezogen in Schüttelkultur.

B. Untersuchung des Gasstoffwechsels und des Cytochromspektrums

Bei den Wachstumsversuchen ergab sich ein großer Unterschied in der Kupferverträglichkeit von Schüttel- und Ruhekulturen. Da anzunehmen war, daß Ruhekulturen gärten und Schüttelkulturen atmeten, konnte die Ursache in der verschiedenen Empfindlichkeit der beiden Enzymsysteme liegen. Außerdem unterscheiden sich gärende und atmende Kulturen durch ihr Cytochromspektrum.

So konnten FINK u. BERWALD (1933) nachweisen, daß unter anaeroben Verhältnissen als Brauereihefe gezogene *Saccharomyces cerevisiae* ein anderes Cytochromspektrum als die unter aeroben Bedingungen gewachsene Bäckerhefe hat. LUERS, KUEHLES u. FINK (1929) fanden bei aeroben Kulturen von *Mucor guilliermondi* zwei Banden, die bei den gärenden Compoundkulturen fehlten. Auf Grund des verschiedenen Vorkommens der Cytochrome bestand die Möglichkeit, daß die Hemmung der Schüttelkulturen durch eine Inhibition des Cytochromsystems bedingt sei, da dieses im Stoffwechsel der gärenden Ruhekulturen von geringerer Bedeutung ist. Nach dem von EPHRUSSI (1956) angegebenen Atmungsschema nach

SLONIMSKI nehmen die Cytochrome eine Schlüsselstellung innerhalb der Atmungsprozesse der Hefe ein. Bei der Inaktivierung dieser Enzyme schaltet der größte Teil der Atmung aus, der Rest verläuft über Flavoproteine. Eine Hemmung von *Neurospora*-Cytochromoxydase durch Kobalt gelang HEALY, SZE-CHUN-CHENG und McELROY (1955); PETRAS (1957) beschreibt eine Beeinflussung des Cytochromspektrums von *Proteus vulgaris* durch Kobalt und LAFORET u. THOMAS (56) konnten die Hämsynthese im Knochenmark durch Kobalt hemmen.

Es wurde durchgeführt: 1. Bestimmung des Gasaustausches nach der \pm KOH-Methode; 2. Untersuchung des Cytochromspektrums.

1. Bestimmung des Gasaustausches

In Ruhekultur gäerte *Mucor adventitius* intensiv; Schüttelkulturen zeigten Atmung und schwache aerobe Gärung (s. Cytochromtabelle S. 246). Im Verlauf des Wachstums der Schüttelkulturen (Abb. 11) zeigte sich eine Übereinstimmung zwischen Gasstoffwechsel und Mycelgewicht. War der RQ-Wert nur um wenig größer als 1, so war der Trockenmycelzuwachs groß; stieg der RQ-Wert, so wurde der Trockenmycelzuwachs geringer und der Gasaustausch wurde größer. Während der Autolyse, wo proteolytische Prozesse vorherrschen (PALLADIN 1910), sank der RQ-Wert, und der Gasaustausch wurde geringer.

Bei Zusatz der 0,1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /l äquivalenten Menge Cu-glycinat war das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle etwas gehemmt. Es zeigte sich bei den Atmungsmessungen eine der Kontrolle ähnliche Übereinstimmung von Trockenmycelgewichtszunahme und Gasstoffwechsel. Es war aber der Gesamt-Gasaustausch wesentlich intensiver und die Trockenmycelzunahme geringer (Abb. 11 und 12). Während der Autolyse sank der RQ-Wert stärker ab als bei der Kontrolle.

Im Gegensatz zu den wachsenden Kulturen zeigten total wachstumsgehemmte Kupferkulturen nur einen geringen Gasaustausch; der RQ-Wert betrug 1,3.

2. Untersuchung des Cytochromspektrums (Tab. 3, S. 246)

Wachsende, atmende Schüttelkulturen in physiologisch alkalischer und saurer Nährlösung besaßen drei intensive Banden. Kulturen aus physiologisch saurer Nährlösung hatten schwächere Banden, die im Gegensatz zu denen aus physiologisch alkalischer Nährlösung durch Reduktion mit Dithionit stark intensiviert wurden. Die Banden traten bei folgenden Wellenlängen auf: 525—30 m μ schwache Bande, 549—70 m μ sehr breite und intensive Bande mit Maxima bei 550 und 562 m μ , 605 m μ schmale, intensive Bande. Die bei *Mucor guilliermondi* beschriebenen Banden lagen bei 562—64 und 605 m μ . KEILIN (1929) gibt für Hefen Absorptionsmaxima bei 519, 549, 564 und 603 m μ an. Gärende Ruhekulturen von *Mucor adventitius* zeigten nur die breite Bande und nach Reduktion mit Dithionit noch eine schwache bei 589—600 m μ bei Kultivierung in physiologisch saurer Nährlösung; in physiologisch

alkalischer Nährlösung dagegen traten nach Reduktion sämtliche Banden, wenn auch sehr schwach, auf. Die in Ruhekulturen auftretenden Cytochrombanden konnten durch eine schwache Atmung neben der intensiven Gärung bedingt sein. Um diese Atmung auszuschließen, wurde unter anaeroben Bedingungen kultiviert. Da das beste Wachstum

und der intensivste Gasaustausch mit dem höchsten RQ-Wert bei Würzeruhekulturen auftrat, wurden Würzekulturen in die Versuche einbezogen. Würzekulturen verlieren unter

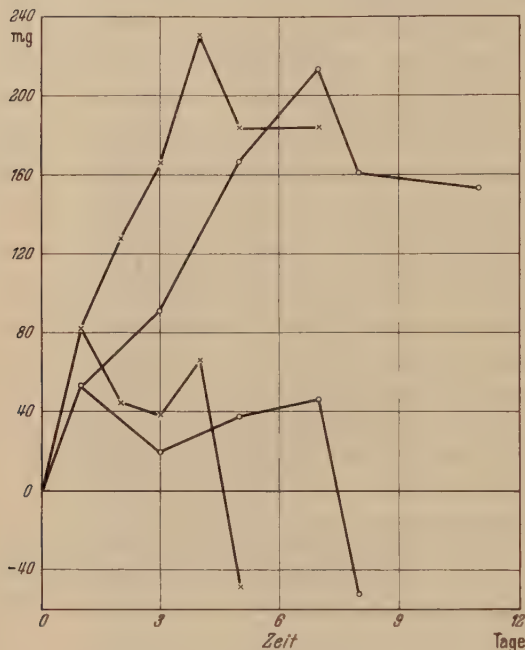


Abb. 11 a

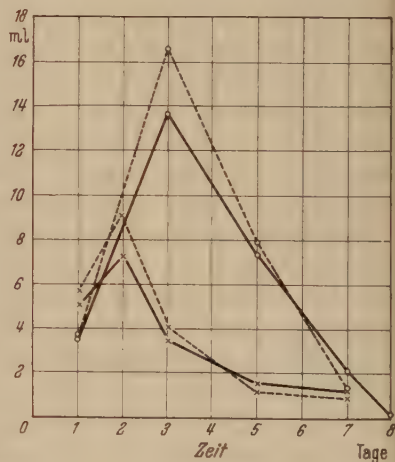


Abb. 11 c

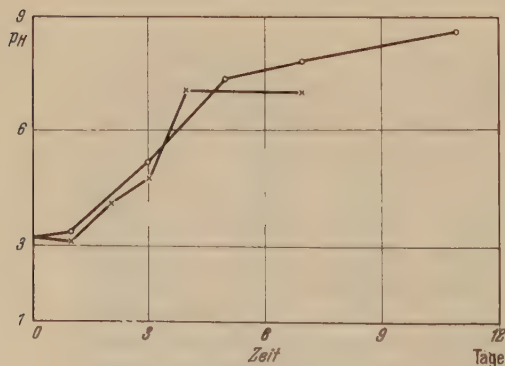


Abb. 11 b

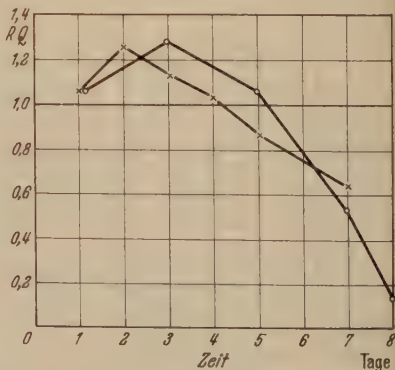


Abb. 11 d

Abb. 11. Kultivierung von *Mucor advertitius* in Schüttelkultur in physiologisch alkalischer Nährlösung. a Wachstumsverlauf und Trockengewichtszunahme je Tag, b pH-Werte, c O_2 -Aufnahme (---) und CO_2 -Abgabe (—)/10 mg Trockenmycelgewicht in 20 min, d RQ-Wert, x Kontrolle, o 0,1 g Cu-glycinat/l

anaeroben Bedingungen die in den Ruhekulturen bei 555–65 $m\mu$ vorhandene Bande. Auch Kulturen in physiologisch saurer Nährlösung besaßen kein Cytochromspektrum mehr. Nur bei Kultivierung in physiologisch alkalischer Nährlösung traten noch zwei schwache Banden auf. Es besteht die Möglichkeit, daß durch Nitratreduktion und innermolekulare Atmung Sauerstoff im Stoffwechsel auftreten kann.

Schüttelkulturen mit 0,1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ zeigten ein unverändertes Cytochromspektrum. Aber die total wachstumsgehemmten Kupferkulturen besaßen unter aeroben Verhältnissen kein Cytochromspektrum, desgleichen die bei dem gleichen Kupferzusatz noch wachsenden Ruhekulturen. Das Impfmateriel dieser Kulturen besaß ein vierbandiges Cytochromspektrum. Somit schien die totale Wachstumshemmung durch das Fehlen der Cytochrome erklärt zu sein.

Bei der Messung des End-pH-Wertes der nicht wachsenden Glycerinkulturen (Tab. 1) fiel eine Übereinstimmung mit nicht wachsenden Glucosekulturen bei hohem Kupferzusatz auf, wenn unter aeroben Verhältnissen kultiviert wurde. Atmungsmessungen zeigten eine weitere Ähnlichkeit im Gasaustausch und im R.Q.-Wert. Glycerinkulturen gärten in Schüttelkultur. Die Glycerinkulturen besaßen genauso wie die Kupferkulturen keine Cytochrome. Auch hier verfügte das Impfmateriel über ein vierbandiges Cytochromspektrum. Es kann somit nicht entschieden werden, ob das Fehlen der Cytochrome auf einer direkten Kupferwirkung oder auf einer Blockierung des Stoffwechsels an anderer Stelle beruht.

IV. Morphologie

A. Wachstum auf Agar

Bei Zusatz von 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ bildete *Mucor advertitius* kaum sichtbare, knötchenförmige Kolonien, ohne Luftmycel und Sporangien. Die Hyphen besaßen Auftreibungen, ähnlich den Riesenzellen von *Aspergillus niger* bei hohem Zinkgehalt (GORBACH u. KOCH 1956). Es können mehrere Auftreibungen in einer Zelle liegen. Von ihnen gehen öfters „hirschgeweihartig“ verzweigte Hyphen aus. Auch die anderen Hyphen waren häufiger verzweigt als bei der Kontrolle; das Mycel machte einen gestauchten Eindruck. Es wurden Kugelhefen gebildet;

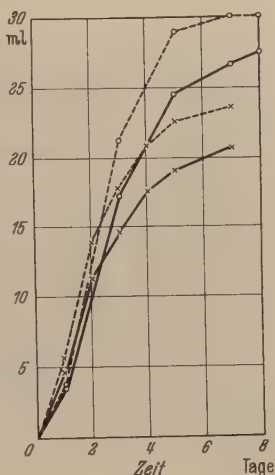


Abb. 12. Gasaustausch von *Mucor advertitius* bei Wachstum in physiologisch alkalischer Nährlösung in Schüttelkultur. — O₂-Aufnahme, ---- CO₂-Abgabe, x Kontrolle, o 0,1 g Cu-glycinat/l

Tabelle 3. *Cytochrome bei Mucor adventitius var. aurantiacus*

Kupfer- konzentration	Kultur- bedingung	N-Quelle	Alter Tage	O ₂ Auf- nahme	CO ₂ Abgabe ¹	Cytochrombanden
normal	Ruhe	Würze	2	7,0	34,8	keine, reduziert: 555—65
normal	anaerob	Würze	3	—	—	keine, reduziert: keine
normal	Schüttel	KNO ₃	2	2,4	1,5	525—30 ² 549—70, Max. 550 u. 62, 605 reduziert: 535 549—70, Max. 550 ³ u. 62, 605—15
normal	Ruhe	KNO ₃	4	8,9	14,95	545—65, 605 reduziert: 535 545—65 605
normal	anaerob	KNO ₃	4	—	—	545—65 605 reduziert: 545—65, Max. 563 605
1 g CuSO ₄	Schüttel	KNO ₃	9	0,35	0,46	keine, reduziert: keine
1 g CuSO ₄	Ruhe	KNO ₃	5	1,95	5,1	keine, reduziert: keine
1 g CuSO ₄	anaerob	KNO ₃	4	—	—	keine, reduziert: keine
normal	Schüttel	(NH ₄) ₂ HPO ₄	2	5,3	7,4	525—30 549—65, Max. 550 605—10 reduziert: 535 ² 549—70, Max. 550 u. 65, 605—10
normal	Ruhe	(NH ₄) ₂ HPO ₄	3	2,6	8,0	545—65, Max. 550 u. 60, 589—605 reduziert: 545—65
normal	anaerob	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4	—	—	keine, reduziert: keine, 545 fraglich
0,5 g CuSO ₄	Schüttel	(NH ₄) ₂ HPO ₄	4	3,38	5,26	keine, reduziert: keine
0,5 g CuSO ₄	Ruhe	(NH ₄) ₂ HPO ₄	5	2,65	8,3	keine, reduziert: keine
normal	Glycerin Schüttel	KNO ₃	9	0,59	0,7	keine, reduziert: keine 545—60 angedeutet
normal	Glycerin Schüttel	(NH ₄) ₂ HPO ₄	9	0,31	0,45	keine, reduziert: keine

¹ je 10 mg Trockenmycel in 20 min. ² schwache Bande. ³ sehr starke Bande.

Vacuolen traten nicht auf. Bei Färbung mit Rubeanwasserstoffsäure waren Hyphen und Auftreibungen gleich intensiv graugrün gefärbt. Wegen der Lipoidlöslichkeit des Kupfer-Rubeanwasserstoffsäurekomplexes wurden Fettfärbungen durchgeführt. Bei Färbung mit Sudan-schwarz waren die Auftreibungen graublau bis schwarz gefärbt (siehe Abb. 13), während die anderen Hyphen völlig ungefärbt blieben. Nach einer Fettextraktion mit einem Äthanol-Äther-Gemisch trat bei Färbung mit Rubeanwasserstoffsäure wieder eine gleichmäßige graugrüne Färbung auf. Ein Unterschied in den Farbintensitäten von fettextrahiertem und unbehandeltem Mycel war weder makro- noch mikroskopisch feststellbar. Das mit Zusatz von 0,1—0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /l gewachsene Mycel war morphologisch nicht verändert. Die Intensität der Anfärbung mit Rubeanwasserstoffsäure nahm mit steigender Kupferkonzentration zu.

Bei Kultivierung mit Cu-Glycinatzusatz entsprach die geringere Wachstumshemmung einer weniger starken morphologischen Veränderung. Bei 1 g CuSO_4 äquivalentem Cu-Glycinat traten wesentlich schwächere Auftreibungen auf als bei 1 g CuSO_4 . Das Mycel färbt sich mit Rubeanwasserstoffsäure auch nach einer Fettextraktion gleichmäßig graugrün. Bei Färbung mit Hämatoxylin war eine Zelle in sich immer homogen blau gefärbt, aber benachbarte Zellen zeigten oft krasse Unterschiede in der Farbintensität. Im Gegensatz zur Rubeanwasserstoffsäurefärbung waren Kugelzellen und Sporen deutlich gefärbt. Bei Fällung mit H_2S -Äthanol waren nur die endständigen Kugelzellen schwarz. Ob eine zusätzliche Granulation durch H_2S -Fällung auftrat, konnte auf Grund der hohen Eigengranulation des Mycels nicht entschieden werden. Es handelt sich hierbei nicht um eine spezifische Kupferfällung, daher traten schwarze Kugelzellen auch bei der Kontrolle auf. Mit geringerem Cu-glycinat-Gehalt gezogene Mycelien zeigten eine schwache Anfärbung mit Rubeanwasserstoffsäure, schwarze Kugelzellen bei H_2S -Fällung und keine morphologischen Veränderungen.

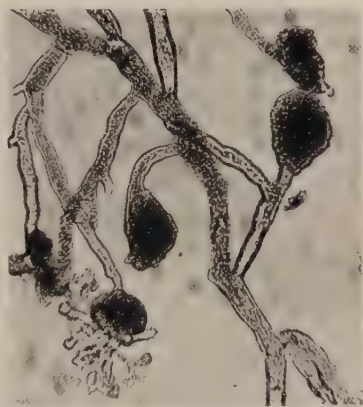


Abb. 13. Auf Agar mit Zusatz von 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /l gewachsener *Mucor adventitius*. 670fache Vergrößerung, Sudanschwarz $1\frac{1}{2}$ Std

B. Wachstum in Nährlösung

Beim Absinken des pH -Wertes zu Wachstumsbeginn in physiologischer alkalischer Nährlösung auf pH 2,7 bildet *Mucor adventitius* wie *Aspergillus*

niger (RIPPEL-BALDES 1955) Riesenzellen, ähnlich denen auf Agar bei hohem CuSO_4 -Gehalt (siehe Abb. 14). Diese Riesenzellen stellen keine Letalformen dar, sie wachsen bei pH -Anstieg mit fädigen Hyphen weiter, werden aber nicht rückgebildet. In Kupferkulturen treten diese Auftreibungen nicht auf, da der pH -Wert nicht so stark absinkt. Bei Zugabe von 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ ist das Mycel nach 4 Kulturtagen mit



Abb. 14. In physiologisch alkalischer Nährlösung bei niederem pH -Wert gewachsener *Mucor adventitius*, 1700fache Vergrößerung, ungefärbt

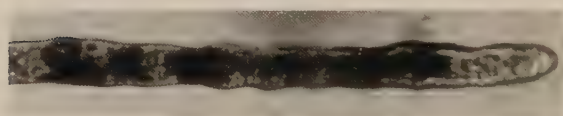


Abb. 15

Abb. 15. In Nährlösung mit Zusatz von 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ gewachsener *Mucor adventitius*, 950fache Vergrößerung, Rubeanwasserstoffsäure



Abb. 16

Abb. 16. In Nährlösung mit Zusatz von 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ gewachsener *Mucor adventitius*, 1200fache Vergrößerung, Rubeanwasserstoffsäure

ist fraglich. Diese homogene Anfärbung macht einer stark aufgeteilten nach dem 12. Kulturtage Platz (Abb. 15). Starke Schwarzfärbung tritt besonders unterhalb von Verzweigungen auf (siehe Abb. 16), aber auch die äußersten Hyphenenden waren aufgeteilt gefärbt (Abb. 15). Es traten daneben Hyphen mit starker Granulation auf. Die bei längerer Kulturdauer in kurzen Schnüren auftretenden Kugelzellen waren sehr stark schwarz granuliert gefärbt. Die strenge Lokalisation beruhte auf der Aktivität der lebenden Zelle. Wurde durch langsames Erhitzen im Dampftopf abgetötetes Mycel in eine CuSO_4 -Lösung gelegt, so färbte sich danach der gesamte Zellinhalt mit Rubeanwasserstoffsäure homogen an. Auch mit 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}/\text{l}$ gewachsenes Mycel war aufgeteilt gefärbt. Bei 0,1 g war die Anfärbung mit Rubeanwasserstoffsäure gering. Mit H_2S -Äthanol trat nur Bräunung des Mycels auf, es wurden keine schwarzen Kugelzellen beobachtet, obwohl im Gegensatz zu Agarkulturen die Kugelzellen mit Rubeanwasserstoffsäure anfärbbar waren.

In Nährlösung mit höheren Kobaltgaben traten sonst nicht beobachtete Kugelzellenverbände auf (Abb. 17), die sich mit Rubeanwasserstoffsäure homogen braun färbten. Eine Speicherung in bestimmten Zellabschnitten wurde nicht beobachtet.

C. Lumineszenzmikroskopische Untersuchungen

Da nach SCHOEN (1949) die Sulfide von Zn, Ca, Mg, Sr, Ba mit Kupfer als Aktivator luminescieren, wurde die H_2S -Fällung im Lumineszenzmikroskop betrachtet. Ein Rückschluß auf die chemische Zusammensetzung war allerdings nicht möglich, da nach BANDOW (1950) sich die Emissionsspektren nicht nur mit der chemischen Zusammensetzung, sondern auch mit dem Aktivatorgehalt ändern. Zu großer Schwermetallsulfidgehalt kann die Lumineszenz abschwächen oder völlig überdecken.

Das auf Agar mit Cu-glycinat gewachsene Mycel zeigte Grünlumineszenz, wobei die bei der H_2S -Fällung im Lichtmikroskop schwarz erscheinenden Kugelzellen besonders stark luminescierten (Abb. 18).

Mit 1 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O/l$ in Nährlösung gewachsenes Mycel zeigte

keine oder nur schwache grüne Lumineszenz. Dagegen leuchtete mit 0,5 g gewachsenes Mycel nur nach H_2S -Fällung, nicht nach Behandlung mit reinem Äthanol, bis zu 8 tägiger Kulturdauer intensiv hellblau. Bei Alterung geht die Lumineszenzfähigkeit verloren. Es treten aber auch bei jungen Kulturen neben lumineszierenden nichtleuchtende Hyphen auf; die beiden Mycelien sind lichtmikroskopisch nicht zu unterscheiden (Abb. 19a und b). Die Mycelien der Kontrolle und aus Nährlösung mit weniger als 0,5 g $CuSO_4 \cdot 5H_2O/l$ zeigten mehr oder weniger starke grüne Lumineszenz (Abb. 20), die mit der Alterung des Mycels langsam verloren ging. Normale Hyphen luminescierten genauso wie Auftreibungen und Kugelzellen (Abb. 20, S. 251). Die Grünlumineszenz war nicht an eine H_2S -Fällung gebunden, sie trat auch nach Behandlung mit Äthanol auf. Die verschiedene Lumineszenz kann nicht erklärt werden.

Zusammenfassend kann gesagt werden: *Mucor advertitius* nimmt während des Wachstums aus kupferhaltigen Nährböden das Schwermetall auf, so daß es histochemisch nachweisbar ist. Bei erhöhtem

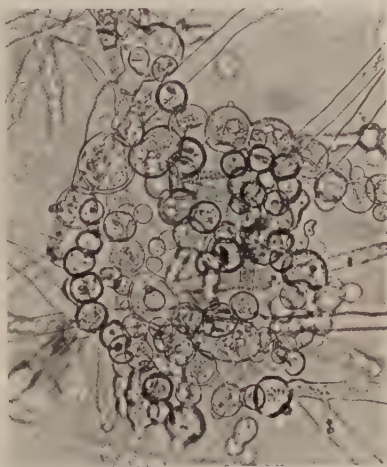
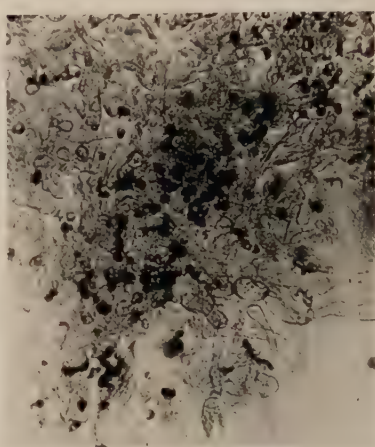


Abb. 17. In Nährlösung mit Kobaltzusatz gewachsener *Mucor advertitius*. 140fache Vergrößerung, ungefärbt!

Kupfergehalt erfolgt eine erhöhte Aufnahme und daher eine stärkere histochemische Anfärbung. *Mucor* bildet auf Agar mit hohen Kupferdosen Riesenzellen, bei Wachstum in stark kupferhaltigen Nährlösungen

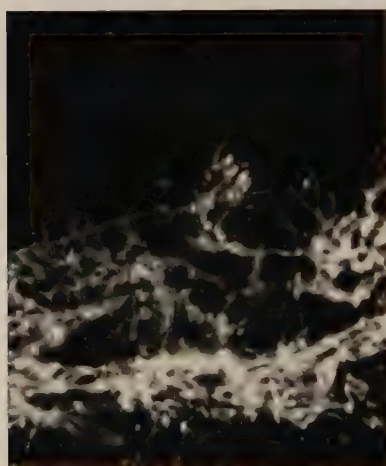


a

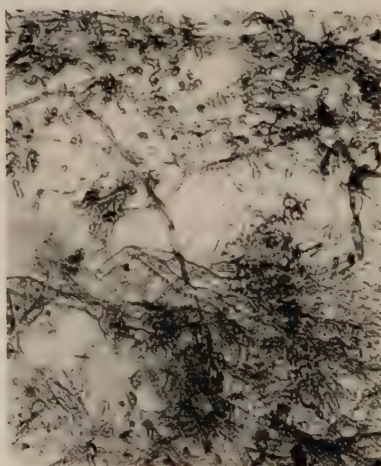


b

Abb. 18. Auf Agar mit Zusatz von 1 g CuSO_4 äquivalentem Cu-glycinat gewachsener *Mucor adventitius*. a H_2S -Fällung Lumineszenzmikroskop 140fache Vergrößerung. b H_2S -Fällung Lichtmikroskop 140fache Vergrößerung



a



b

Abb. 19. In Nährlösung mit Zusatz von 0,5 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /l gewachsener *Mucor adventitius*. a H_2S -Fällung Lumineszenzmikroskop. 140fache Vergrößerung. b H_2S -Fällung Lichtmikroskop, gleiches Mycel. 140fache Vergrößerung

tritt eine bevorzugte Lokalisation des Schwermetalls innerhalb der Zelle auf. Der größeren histochemisch nachweisbaren Kupfermenge entspricht eine stärkere Stoffwechselstörung.

Diskussion

Seit den Versuchen von BORTELS (1927) ist bekannt, daß Kupfer ein für das Wachstum von Pilzen notwendiges Spurenelement ist. Im Gegensatz zu dem Ascomyceten *Aspergillus niger* benötigt der Phycomycet *Mucor adventitius* nur Konzentrationen unter $1 \gamma/l$ zum Wachstum und zur Sporenbildung. Der Pilz zeigte eine große Empfindlichkeit gegenüber etwas erhöhten Kupferkonzentrationen. Vor allem Schüttelkulturen waren durch anomale Kupferdosen stark geschädigt. Die große

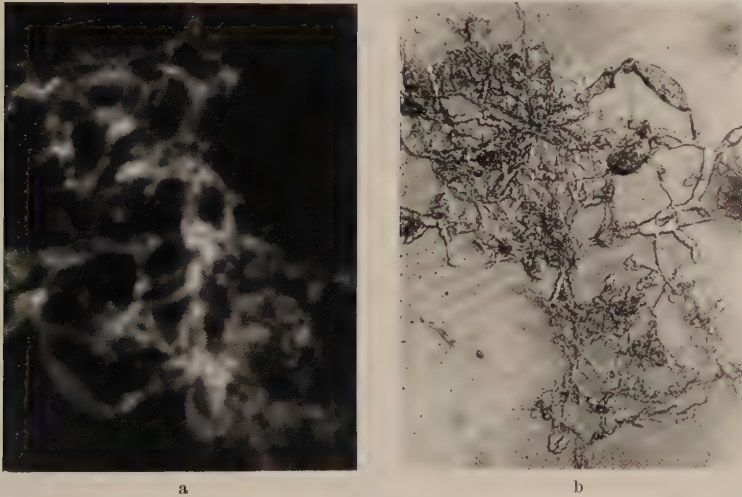


Abb. 20. In physiologisch alkalischer Nährlösung gewachsener *Mucor adventitius*. a H_2S -Fällung Lumineszenzmikroskop. 140fache Vergrößerung. b H_2S -Fällung Lichtmikroskop, gleiches Mycel. 140fache Vergrößerung

Empfindlichkeit der atmenden Schüttelkulturen ließ auf eine Beeinflussung des Atmungssystemes schließen. Eine Beziehung zwischen Kobalt-Hemmeffekt und Belüftungsverhältnissen wurde von SCHADE (1949) und PETRAS (1957) bei *Proteus vulgaris* beobachtet. Atmung wurde bei *Bacillus asterosporus* (DEDIC u. KOCH 1955) und *Clostridium perfringens* (SHANKAR u. BARD 1955) unter Kobalteinfluß zugunsten einer homolaktischen Gärung unterdrückt. TOLBA u. GHANEM (1954) fanden eine Atmungshemmung bei den Naßfäule verursachenden *B. aroidea*, *B. carotovorum* und *B. phytophthorum*. Bei *Mucor adventitius* wurde bei Zusatz von $0,1 \text{ g CuSO}_4 \cdot 5H_2O/l$ äquivalentem Cu-glycinat eine Erhöhung des Gasaustausches und ein geringeres Trockenmycelgewicht im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Die geringere Mycelausbeute ist dadurch bedingt, daß ein größerer Teil des verfügbaren Kohlenstoffs veratmet wird. Total wachstumsgehemmte Kupferkulturen zeigten nur aerobe Gärung.

Die Ursache der Kupferwirkung schien durch das Fehlen der Cytochrome erklärbar zu sein. HOLLMANN u. THOFERN (1955) vertreten die Ansicht, daß Apoferment und prothetische Gruppe des Cytochroms in der Zelle getrennt synthetisiert werden und dann über das Eisen des Hämins miteinander verknüpft werden. Dieses konnten sie an Hand einer häminbedürftigen *Staphylococcus*-Mutante nachweisen, die zwar mit Chlorhäm in ein Cytochromspektrum aufzubauen vermochte, dazu aber nicht imstande war, wenn statt dessen eisenfreies Protohäm in angeboten wurde. Daraus kann gefolgert werden, daß bei Schwermetalleinfluß die Stellen des Apofermentes, die die Bindung mit dem Hämineisen eingehen, durch das Schwermetall geblockt werden. PETRAS (1957) fand aber, daß *Proteus vulgaris*, der unter Kobalteinfluß in Flüssigkeitskultur seine Cytochrome verliert, weder in Gegenwart noch in Abwesenheit von Kobalt größere, quantitativ erfaßbare Porphyrinmengen ausscheidet. Daß die mit dem Impfmateri al eingebrachten Cytochrome verloren gehen, kann durch das im Organismus vorhandene Gleichgewicht zwischen Abbau und Synthese der Fermente erklärt werden, das unter Kupfereinfluß gestört wird.

Aber bei den unter anderen Gesichtspunkten durchgeführten Kultivierungsversuchen mit Glycerin als C-Quelle und anorganischem Stickstoff besaßen die nicht wachsenden Pilze auch hier unter aeroben Verhältnissen keine Cytochrome. Das Fehlen des Cytochromspektrums bei Kultivierung auf Glycerin als C-Quelle und Nitrat wird von DÖLLE (1957) bei *Streptomyces* beschrieben. Es besteht daher die Möglichkeit, daß das Fehlen des Cytochromspektrums unter Kupfereinfluß sekundärer Natur ist.

Die geringere Wachstumshemmung durch Kupferaminosäurekomplexe kann durch eine geringere Toxizität des gebundenen Kupfers erklärt werden. Eine Änderung der fungistatischen Wirkung durch verschiedene chelatbildende Reagentien erhielten BYRDE u. WOODCOCK (1957) mit Oximen, JOHSYR (1955) mit Dicarbamy lverbindungen. Inwieweit die von anderen Autoren beobachtete Aufhebung der Hemmwirkung des Kupfers durch Zugabe von Glutaminsäure auf einer Bildung des wasserunlöslichen 1 : 1 Cu-glutamats beruht, ist fraglich. Dasselbe gilt für die mit Asparaginsäure gemachten Beobachtungen, da diese ebenfalls mit Kupfer einen unlöslichen 1 : 1 Komplex bildet.

Die geringere Empfindlichkeit der Ruhekulturen in physiologisch alkalischer Nährlösung kann durch eine Bindung des Kupfers an auftretende Säuren erklärt werden. So fand PRATT (1953) eine Herabsetzung der Kupferwirkung auf *Mycobacterium phlei* durch Citronensäure und HORIO, HAGASHI u. OKOMUKI (1955) eine Herabsetzung bei *Mycobacterium tuberculosis* durch Äpfelsäure, Citrat, Tartrat, Acetat und Succinat. *Mucorineen* sind intensive Säurebildner, sie bilden vor

allem Oxalsäure, und SCHMIDT-LORENZ (1956) fand bei *Aspergillus niger*, daß gerade Oxalsäure in physiologisch alkalischer Nährlösung lange erhalten bleibt. Die während des Wachstums auftretende intensive grüne Farbe der vorher farblosen kupferhaltigen Nährlösung macht eine derartige Annahme wahrscheinlich.

Das geringe Myceltrockengewicht in physiologisch saurer Nährlösung in Ruhekultur könnte noch durch den von K. RIPPEL (1931) für *Mucor silvaticus* beschriebenen Robbinseffekt erklärt werden, welcher besagt, daß rechts vom IEP (p_H 4,5) Kationen, links Anionen besser aufgenommen werden. Gerade in physiologisch saurer Nährlösung sinkt der p_H -Wert sehr schnell ab, so daß das frühe Wachstumsmaximum und damit verbunden das geringe Mycelgewicht nur auf einer Wachstums-
hemmung durch zu große Acidität beruhen kann.

Bei den morphologischen Untersuchungen zeigte sich eine deutliche Veränderung des Pilzes bei Wachstum auf Agar unter Kupfereinfluß. Es ist aber anzunehmen, daß die gebildeten Auftreibungen und das gestauchte Mycel mehr eine allgemeine Reaktion von Pilzen auf veränderte Umweltseinflüsse darstellt, da von *Mucor adventitius* Riesenzellen auch bei niederem p_H -Wert in Nährlösung gebildet werden.

Riesenzellen bei *Mucor janssenii* und *Mucor silvaticus* werden von ZOBL (1943) und RIPPEL-BALDES (1955) beschrieben. Ähnliche Formen wurden bei *Aspergillus niger* bei hohem Zinkgehalt (GORBACH u. KOCH 1955) und bei niederem p_H -Wert (RIPPEL-BALDES 1955) und von KELLNER (1955) bei *Ankistrodesmus braunii* unter Rb-Einfluß beobachtet. HEINTZELER (1939) beschreibt gestauchtes Mycel bei *Phycomyces nitens* bei geringer relativer Dampfspannung und LANGE DE LA CAMP u. STEINMANN (1953) sprechen von blumenkohlartigem Mycel bei *Mucor racemosus* auf Agar bei hohem Nickelgehalt.

Die bei Wachstum in Nährlösung auftretende stark lokalisierte Schwermetallspeicherung in einzelnen Zellabschnitten beruhte auf der Aktivität der lebenden Zelle. TROEGER (1956/57) fand bei *Fusarium decemcellulare*, daß die Kupferspeicherung an die Oxydaseaktivität gebunden war. LANGE DE LA CAMP u. STEINMANN (1953) fanden bei *Mucor racemosus* nur eine homogene Grünfärbung des Mycels mit Rubeanwasserstoffsäure, dagegen eine lokalisierte Speicherung bei *Saccharomyces cerevisiae*. Bei der beinahe schwarzen Anfärbung von *Mucor adventitius* mit Rubeanwasserstoffsäure nach Kultivierung in stark kupferhaltiger Nährlösung ist es fraglich, ob es sich hierbei um eine enorme Kupferspeicherung anderer Art oder um die Anfärbung komplexgebundenen Kupfers handelt. Kupferamino-säurekomplexe ergaben mit Rubeanwasserstoffsäure einen braunen Niederschlag. Die Möglichkeit einer Bindung der Schwermetalle an Aminosäuren innerhalb der Zelle wird von NEYLAND, DUNKEL u. SCHADE (1952) diskutiert.

Die bei den lumineszenzmikroskopischen Untersuchungen auftretenden verschiedenen Lumineszenzerscheinungen können nicht erklärt werden.

Zusammenfassung

1. Bei *Mucor adventitius* konnte keine Phenolase nachgewiesen werden, die die in der Autolyse verschwindenden Aminosäuren zu dem gelben Farbstoff oxydiert. Der Farbstoff ist ein Carotinoid.

2. In den Fruchtkörpern von *Coprinus lagopus* wurde eine Laccase nachgewiesen.

3. In kupferverarmerter Nährlösung wuchs *Mucor adventitius* gut, Kupferkonzentrationen über 55 γ /l erwiesen sich als wachstumshemmend. Im Vergleich zu *Aspergillus niger* benötigt dieser Pilz, wenn überhaupt, sehr viel niedrigere Kupferkonzentrationen.

4. Auf Agar nach LANGE DE LA CAMP u. STEINMANN (1953) trat bei Zugabe von 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /l nur noch Wachstum in Form kleiner knötchenartiger Kolonien auf. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ erwies sich als toxischer als Cu-glycinat.

5. Bei Wachstum in Ruhe- und Schüttelkulturen waren die Schüttelkulturen empfindlicher gegenüber Kupfer, bei Zusatz von 0,5 und 1 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ /l trat in Gegensatz zu den Ruhekulturen kein Wachstum mehr auf. Kupferamino-säurekomplexe zeigten geringere toxische Wirkung als CuSO_4 .

6. Die durch Kupfer im Wachstum geringfügig gehemmten Kulturen besaßen einen intensiveren Gasaustausch. Total wachstumsgehemmte Kulturen zeigten nur geringen Gasaustausch bei aerober Gärung.

7. Atmende Schüttelkulturen besaßen ein dreibandiges Cytochromspektrum, das in Ruhekultur teilweise und bei Kultivierung unter anaeroben Verhältnissen ganz verloren ging. Total wachstumsgehemmte Kupferkulturen besaßen kein Cytochromspektrum, obwohl sie unter aeroben Verhältnissen kultiviert worden waren.

8. Mit Glycerin als C-Quelle trat mit anorganischem Stickstoff kein Wachstum auf. Nicht wachsende Glycerinkulturen besaßen keine Cytochrome.

9. Das von der Zelle aufgenommene Kupfer konnte histochemisch nachgewiesen werden. Auf Agar traten unter Kupfereinfluß Riesenzellen auf. In Nährlösung mit hohem Kupferzusatz gezogene Mycelien zeigten keine morphologische Veränderung, aber eine bevorzugte Speicherung in einzelnen, nicht näher definierten Zellabschnitten.

Herrn Prof. Dr. A. RIPPEN-BALDES bin ich für die Anregung und seine Ratschläge bei der Durchführung der Arbeit zu großem Dank verpflichtet. Herrn Prof. Dr. K. THOMAS danke ich für das großzügige Entgegenkommen, in seinem Institut arbeiten und die dortigen apparativen Hilfsmittel benutzen zu dürfen. Für praktische Beratung und wertvolle Diskussion danke ich den Herren Dr. E. THOFERN und Dr. F. J. STRECKER.

Literatur

- BANDOW, F.: Luminescenz. Stuttgart: Wiss. Verlagsgesellschaft m. b. H. 1950. — BEHR, G.: Arch. Mikrobiol. **1**, 418 (1930). — BERNHAUER, K.: Gärungs-chemisches Praktikum. Berlin: Springer 1930. — BRUCKER, W.: Arch. Protistenk. **100**, 338 (1955). — Flora (Jena) **142**, 343 (1955). — Naturwissenschaften **43**, 450 (1956). — Arch. Mikrobiol. **26**, 302 (1957). — BYRDE, R. J. W., and D. WOODCOCK: Nature (Lond.) **179**, 539 (1957).
- DEDIC, G. A., u. O. G. KOCH: Arch. Mikrobiol. **23**, 130 (1955). — DÖLLE, H.: Arch. Mikrobiol. **28**, 89 (1957).
- EPHRUSSI, B.: Naturwissenschaften **43**, 505 (1956).
- FINK, H., u. E. BERWALD: Biochem. Z. **258**, 141 (1933).
- GORBACH, G., u. O. G. KOCH: Arch. Mikrobiol. **23**, 284 (1956).
- HAGEN, O.: Vidensk. Selsk. Skrift. 1, Math. Nat. Klasse 4, **60**, 1 (1910), zit.
- BROWN, W.: Physiology of Fungi, University of London Press 1950. — HEALY, W. B., SZE-CHUN-CHENG and W. D. McELROY: Arch. Biochem. **54**, 206 (1955). — HEINTZELER, I.: Arch. Mikrobiol. **10**, 92 (1939). — HEYKE, H. E.: Diss. Göttingen 1954. — HERRMANN, K.: Pharmazie **9**, 212 (1954). — Naturwissenschaften **42**, 16 (1955). — HOLLMANN, S., u. E. THOFERN: Naturwissenschaften **42**, 586 (1955). — HORIO, T., T. HAGASHI u. K. OKUMUKI: J. Biochem. (Tokyo) **42**, 481 u. 491 (1955). — HOROWITZ, N. H., and SAN-CHIUN-SHEN.: J. biol. Chem. **197**, 613 (1952).
- JOHSYR, J.: Nature (Lond.) **175**, 820 (1955).
- KARRER, P., u. E. JUCKER: Carotinoide. Basel: Birkhäuser Verlag 1948. — KELLIN, D., u. T. MANN: Nature (Lond.) **145**, 304 (1940). — KELLIN, D.: Proc. roy. Soc. B. **104**, 206 (1929). — KELLNER, K.: Biol. Zbl. **74**, 662 (1955). — KUBOWITZ, F.: Biochem. Z. **292**, 221 (1937). — KÜSTER, E.: Zbl. Bakt., 1. Abt. **160**, 207 (1953/54).
- LAFORET, M. T., u. E. D. THOMAS: J. biol. Chem. **218**, 595 (1956). — LANGE DE LA CAMP, M., u. W. STEINMANN: Arch. Mikrobiol. **19**, 87 (1953). — LINDBERG, G., u. G. HOLM: Phys. Plant. **5**, 100 (1952). — LÜERS, H., R. KÜHLES u. H. FINK: Biochem. Z. **217**, 253 (1929).
- MULDER, E. G.: Arch. Mikrobiol. **10**, 72 (1939).
- NEYLAND, M., P. DUNKEL u. A. L. SCHADE: J. gen. Microbiol. **7**, 409 (1952).
- OKAMOTO, K., u. M. UTAMURA: Acta Sch. med. Univ. Kioto **20**, 573 (1936).
- PALLADIN, W.: Fortschr. d. Naturf. I (St. Petersburg) 1910, zit. Haeft 284 (1936). — PETRAS, E.: Arch. Mikrobiol. **28**, 138 (1957). — PRATT, D.: J. Bact. **65**, 157 (1953).
- RIPPEL-BALDES, A.: Grundriß der Mikrobiologie, 3. Aufl. Springer 1955. — RIPPEL, K.: Arch. Mikrobiol. **2**, 72 (1931). — RITTER, R.: Arch. Mikrobiol. **22**, 248 (1955).
- SCHMIDT-LORENZ, H.: Arch. Mikrobiol. **25**, 137 (1956). — SCHÖN, M.: zit. D'ANS, J., u. E. LAX: Taschenbuch f. Chemiker u. Physiker. Springer 1949. — SHANKAR, K., u. R. S. BARD: J. Bact. **69**, 436 u. 444 (1955).
- TOLBA, M. K., u. S. S. GHANEM: Bot. Nat. (Lund) **207** (1954), zit. Ber. Biol. Berlin. **94**, 348 (1955). — TRÖGER, R.: Arch. Mikrobiol. **25**, 166 (1956/57).
- WALLENFELS, K., u. E. v. PECHMANN: Angew. Chem. **63** (1951). — WITTMANN, H.: Arch. Mikrobiol. **25**, 373 (1957). — WOLFF, K., u. A. EMMERLIE: Biochem. Z. **228**, 443 (1930).
- ZOBL, K. H.: Arch. Mikrobiol. **13**, 207 (1943).

(Aus dem Institut für Forstbotanik und Forstgenetik
der Universität Göttingen in Hann. Münden)

Untersuchungen zur Verbreitung und Systematik der *Mortierellen*

Von

GERMAINE LINNEMANN*

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 19. März 1958)

Meine bisherigen Untersuchungen hinsichtlich des Gehalts verschiedener Böden an *Mucorineen*, vor allem *Mortierellen*, erfassen diese Pilze weniger quantitativ als qualitativ; und zwar begnügte ich mich, da sich Malzextrakt-Agar (3% Malz, 1,8% Agar) im allgemeinen als am günstigsten herausstellte, meist mit dem Ausstreichen der Erdkrümchen auf diesen Nährboden und Isolieren der keimenden *Mucorineen*. Es lag mir daran: 1. einen Überblick über die vorhandenen, auf diesem Nährboden wachsenden Arten zu bekommen, 2. zur Klärung des Zusammenhanges zwischen diesen Arten und dem Standort beizutragen, 3. die Verbreitung der Arten zu ermitteln.

Nachdem ich seit 1941 die in meiner Monographie (LINNEMANN 1941) der Gattung *Mortierella* dargestellten Arten und Standorte weiterhin untersuchte und noch viel Material zusammentragen konnte, war es mir besonders wertvoll, Böden aus extremen Vegetationsgebieten auf ihren *Mortierellengehalt* untersuchen zu können. Das waren vor allem verschiedene Bodenproben aus Mexiko, wofür ich Herrn Prof. Dr. SCHMUCKER auch an dieser Stelle sehr danke, und solche aus Abisco (schwedisch Lappland), die mir Herr Prof. Dr. HARDER liebenswürdigerweise zur Verfügung stellte. Viele der übrigen untersuchten Erdproben hat ebenfalls Herr Prof. SCHMUCKER gesammelt. Zwar sollen die Untersuchungen in der bisher geübten Weise noch fortgesetzt werden. Jedoch gibt das vorliegende Material schon gewisse Hinweise für spätere Untersuchungen des physiologischen und ökologischen Verhaltens der *Mucorineen*, insbesondere der *Mortierellen*. Zu den insgesamt 16 in den Bodenproben aus Mexiko und von Abisco gefundenen *Mortierella*-Arten wurden deshalb im folgenden die bisher ermittelten sonstigen Fundorte angegeben.

* Herrn Professor Dr. PETER CLAUSSEN zum 80. Geburtstag!

A. Die Bodenproben aus Mexiko

1. Südlich von San Cristobal (Südmexiko). Lichter Hochwald auf Kalk, in etwa 2500 m Höhe ü. M. Bestand von *Pinus leiophylla* usw.; Boden mit ganz niedrigem, dichtem Trockenrasen, Nadelstreu; beste Humuszersetzung; tiefer rotbrauner Boden. p_H 5,1.

Mort. minutissima; sonstiges Vorkommen: aus 30 Waldböden mit p_H -Werten (4,6) 5,3—6,8 (7,6). Besonders in kalkreichen Böden, vor allem unter Buche, aber auch unter Nadelbäumen, u. a. in Südfrankreich, und zwar: bei Carcassonne, Bu-Ta-*Buxus*-Bestand; bei St. Guilhem-le-Desert, unter *Pinus salzmannii*; bei Grenoble, unter *Quercus pubescens*; bei Nizza, Chateau. Außerdem südlich Bruneck, Südtirol, unter *Picea excelsa* auf steilem W-Hang.

Obige Böden zeichnen sich fast alle durch besonders guten Humuszustand aus!

Mort. verticillata; sonstiges Vorkommen: nur wenige Male isoliert; anscheinend vorwiegend in sehr sauren Böden (vgl. Abisco), aber auch einmal unter *Pinus silvestris* auf Kalk b. Lienz.

Mort. ramanniana; sonstiges Vorkommen: in etwa 25 Böden mit p_H 4—5 (vereinzelt weniger sauer), überwiegend unter Fichte, aber auch unter Kiefer und gelegentlich unter Laubhölzern.

2. Etwa 15 km südlicher als Nr. 1, etwa 2200 m. Kalk. Ziemlich dichter immergrüner Eichenwald. Boden mit mäßig dichter Strauchschicht; beste Humuszersetzung. p_H 6,3.

Mort. spinosa; sonstiges Vorkommen vgl. Mexiko 3.

3. Nevado de Toluca (Zentralmexiko). Kiefern-Hochwald mit etwas immergrünen Eichen; dichter Bodenbewuchs. Etwa 3000 m. p_H 5,2.

Mort. spinosa; sonstiges Vorkommen: aus etwa 30 verschiedenartigen Böden isoliert, p_H 4,1—7,4; meist jedoch aus Kalk- oder Basaltböden unter Laubbäumen; u. a. auch in einem Buchen-Tannen-*Buxus*-Bestand bei Carcassonne im südwestl. Frankreich.

Mort. humilis; sonstiges Vorkommen: aus über 40 Böden isoliert, mit p_H -Werten 3,9—5,3 (5,6; 5,9; 6,4), sowohl unter Nadel- wie auch unter Laubbäumen, meist jedoch unter Buche oder Fichte in ziemlich sauren Böden.

Mort. verrucosa; sonst nur einmal unter einem Fichten-Hochwald b. Kassel in 560 m ü. M. isoliert (p_H 4,0).

4. Morelo (Zentralmexiko). Wald mit immergrünen Eichen und *Arbutus*. Etwa 2600 m. p_H 6,2.

Mort. elongata; sonstiges Vorkommen: aus etwa 30 Böden isoliert, p_H 4,0—6,9; in Laub- und Nadelwald. Es scheint sich bei dieser Art um einen recht widerstandsfähigen Pilz zu handeln; diesbezüglich erwähnenswerte Fundorte sind u.a.: Steinberg b. Münden, etwa 500 m,

nahe einer Sumpfstelle, p_H 5,3; Acker b. Hedemünden, Muschelkalk, p_H 6,9; bei Wasserburg a. Inn, unter einer Brandstelle, p_H 4,3; Ismaninger Moor b. München, unter Fichte, p_H 4,5; Muottas Muraigl b. Pontresina, 2456 m, unter *Juniperus nana*, p_H 5,4; Linguaglossa, 600 m, am Ätna, Übergang vom Lauretum zum Castanetum, p_H 5,7; Albergo Etna (häufig isoliert!), 1820 m am Ätna; ziemlich dichter, bis etwa 2 m hoher Buschwald von *Genista aetnensis*, oberes Fagetum auf dem Übergang zum Alpinetum, p_H 5,8; Vizzavona, Korsika, etwa 1160 m, unter *Fagus sylvatica*, p_H 5,5; Valdo-Niello, Buche-Tanne-Kiefer-Birke-Mischbestand, unter Tanne, p_H 5,2; Erde vom Brocken, p_H 4,0; in Schwermetallboden, Siebertal, Harz, unter *Armeria halleri*, p_H 5,7.

5. Tropischer Regenwald. Kaffeeplantage Finca La Violetta (Chiapas, nördlich Tapachula, nahe der Grenze von Guatemala). Etwa 500 m; Westexposition, p_H 4,8.

Mort. spec.; diese Art war bisher nicht zu identifizieren. Das Substratmycel ist schwach ausgeprägt gelappt, das Luftmycel nach den Rändern der Petrischale dicht und wattig ausgebildet. Die Hyphen sind sehr ölreich, der Geruch nur schwach typisch. Sporangien und Anastomosen konnten nicht aufgefunden werden. Hingegen waren in etwas älteren Kulturen unregelmäßige, gemmenartige Mycelbildungen ziemlich häufig.

In weiteren Ausimpfungen dieser Erdprobe wurden keine *Mortierellen* mehr isoliert, der Gehalt scheint also sehr gering zu sein.

6. Mexiko, Laventa (Mexiko, DF; Zentralmexiko). Wald von *Abies religiosa*. 2700 m. p_H 5,6.

Mort. exigua; diese Art wurde sonst fast nur auf Kalkböden (etwa 15—20 mal) gefunden, unter Laub- oder Nadelbäumen, p_H 5,3—7,4.

Mort. elongata; vgl. übriges Vorkommen unter 4.

7. Mazatlan (nahe der pazifischen Küste; 23° Nord). Dornbusch. 20 m. p_H 6,2.

Keine *Mucorineen*. Außer *Fungi imperfecti* viel *Aspergillus niger*.

8. San Blas (Pazifische Küste; 21° Nord). Mangrove (*Rhizophora*). p_H 6,1.

Keine Pilze, nur Bakterien.

9. Sierra Madre occidental. Östl. von Topia (25° Nord). 2800 m. Hochwald von *Pinus durangensis*. p_H 4,1.

Mort. elongata; sonstiges Vorkommen siehe unter 4 u. 6.

Mort. vinacea; sonstiges Vorkommen: aus etwa 12 Böden isoliert, p_H -Werte 3,4—5,6; vorzugsweise unter Fichten; am Patscherkofel b. Innsbruck oberhalb der Baumgrenze unter *Anemone vernalis* und *Ericaceen*; auch unter Tanne (Wiener Wald; Bad Grund im Harz); im Ötztal, Obergurgl, Nordtirol, in der obersten Kampfzone (2070 m) von *Pinus cembra*, Vaccinietum, p_H 4,9.

10. Queretaro (Zentralmexiko). *Opuntien*-Bestand. pH 6,7.

Mort. schmuckeri n. sp.; in diesem Boden fand ich mehrmals nur eine mir bis dahin noch unbekannte Art, die ich im Anhang beschreibe.

11. Mil Combres (Zentralmexiko). Etwa 2800 m. Hochwald von *Pinus* und *Abies*. pH 4,9.

Mort. ramanniana; sonstiges Vorkommen vgl. 1.

Mort. marburgensis; mir aus etwa 15—20 verschiedenen Böden sonst bisher bekannt, pH 3,4—4,9 (5,5 = nur einmal unter *Picea* auf Gipsboden b. Walkenried a. Harz); meist unter Fichte oder Kiefer; auch im Ötztal, Obergurgl, Nordtirol, in 2070 m Höhe, in der Kampfzone von *Pinus cembra* unter *Vaccinien*, pH 4,9.

12. Quiroya (Zentralmexiko). Etwa 1600 m. Buschwald von Eichen. pH 6,2.

Mort. alpina; sonstiges Vorkommen: etwa aus 25 Böden isoliert, fast nur auf Kalk, häufig an sehr warmen Standorten, pH-Werte bis 7,3, auch in gedüngten Böden wie Gartenerde, Acker (Abisco!), Wegabstich; im Hinblick auf das obige mexikanische Vorkommen wäre noch hervorzuheben: Wiener Steinfeld unter *Quercus pubescens* und *Pinus austriaca*, pH 5,4; unter *Cistus monspeliensis*, b. Ajaccio, Korsika, pH 6,2; unter *Pinus pinea*, b. Ajaccio, Korsika, pH 6,0; Südtirol, Franzensfeste, Südhang unter *Pinus silvestris*, pH 6,1; St. Guilhem-le-Desert, Cevennen, unter *Pinus salzmannii*, pH 6,5; Alpilles, Provence, pH 8,4; Amlach b. Lienz, unter *Rhododendron hirsutum*, pH 5,0; Nizza, Chateau, pH 6,1; b. Innsbruck, unter *Pinus silvestris* und *Erica carnea*, etwa 600 m; Gadertal, Südtirol, 1100 m, steiler W-Hang, unter *Picea excelsa*.

Mort. ramanniana var. *angulispora*; seltener in anderen Böden gefunden, etwa 7 mal, meist aber in ziemlich sauren Böden. Außer solchen sauren Standorten (unter Fichten an Wegen, b. Münden, Schreiberhau i. Riesengebirge; vgl. auch Abisco), auch unter *Picea* auf Gips (pH 5,5); unter *Ericaceen* b. Brixen, 2100 m, pH 4,7; von Felsen auf Muottas Muraigl, 2456, pH 4,4. Anscheinend bevorzugt dieser Pilz mehr mineralische Böden.

Mort. spinosa; Vorkommen in anderen Böden vgl. 3.

13. Nevado de Toluca. Etwa 3700 m, nahe der Baumgrenze. Lichter *Pinus*-Hochwald, dichter Graswuchs, Brandfläche. pH = 5,0.

Mort. ramanniana; sonstiges Vorkommen siehe 1. Aus dieser mexikanischen Bodenprobe wurde der Pilz häufig isoliert. Jedoch war er vom Typ in jeder Isolierung abweichend. Wegen der spärlichen Sporangienbildung war bzw. ist noch die Kultur fast weiß (Weiß nach fast 4 Jahren noch vorherrschend!) und nur schwach rosa getönt; jedoch sind die schwer auffindbaren Träger mit einer Querwand in der für *M. ramanniana* typischen Weise versehen, und eine, allerdings sehr kleine Columella ist

vorhanden. Die für die Art typischen ölreichen Gemmen sind in sehr großer Zahl vorhanden, auch ist das Mycel sehr ölreich.

Mort. vinacea; sonstiges Vorkommen siehe unter 9. Auch dieser Pilz weicht durch sein fast weißes Aussehen (Weiß nach fast 4 Jahren noch vorherrschend!) von dem kräftig violett-roten Farbton des Typs ab. Die sehr feinen Hyphen sind ölreich und die ziemlich kleinen typischen Gemmen verhältnismäßig reichlich und desgleichen ölreich.

Außer den obigen Vertretern der sectio *Pusilla* wurden trotz wiederholten Ausimpfens in dieser Bodenprobe keine *Mortierellen* gefunden. Hingegen enthielt sie an *Mucor*-Arten, abgesehen von *Muc. hiemalis*, noch in großer Häufigkeit *Mucor griseo-roseus*, einen Pilz, den ich bisher nur einmal und zwar in einem Buchenbestand bei Marburg (1933) isoliert hatte. Die Merkmale der von mir 1935 als nov. spec. beschriebenen Art stimmten bei den Abimpfungen aus obiger Erde völlig mit der Originaldiagnose überein.

An sonstigen *Mucorineen* fand ich in den mexikanischen Böden: in 1: *Absidia cylindrospora*, in 2: *Mucor corticolus*, in 3 u. 4: *Mucor hiemalis*, in 5: *Absidia cylindrospora*, in 9: *Absidia* spec. und *Mucor* spec. (sect. *Hiemalis*), in 10: *Rhizopus* spec., in 11: *Mucor corticolus*, in 12: *Mucor spinosus* (viel!).

Zusammenfassend läßt sich über die 13 mexikanischen Bodenproben feststellen:

1. Es wurde nur eine neue Art gefunden, und zwar in Boden von einem *Opuntien*-Bestand (10), hier nur diese.
2. Kein Pilz wurde in Erde von einem Mangrove-Bestand (8) gefunden.
3. Keine *Mucorinee*, jedoch *Fungi imperfecti* und besonders *Aspergillus niger* waren im Dornbusch-Boden in Mazatlan (7),
4. nur eine (unbestimmte) *Mortierella* war in Erde aus trop. Regenwald im südl. Chiapas (5).
5. In den übrigen Böden wurden schon bekannte *Mortierellen* gefunden. Ihr Standort entsprach solchen auf deutschem bzw. europäischem Gebiet. In 3700 m auf dem Nevado de Toluca, nahe der Baumgrenze kam reichlich *Mortierella ramanniana*, vereinzelter *Mort. vinacea* vor; und zwar mit wenig Sporangien-, hingegen reichlicher Gemmenbildung, woraus eine im allgemeinen seltener auftretende helle Farbe der Kolonie zurückzuführen war.
6. An *Mucoraceen* wurden Arten aus der sectio *Hiemalis*, *Absidien*, sowie auch *Rhizopus* (10) isoliert. Auffallend war das ungewöhnlich reiche Vorkommen von *Mucor griseo-roseus* (LINNEMANN 1936) in der Erdprobe vom Nevado de Toluca in 3700 m Höhe, einer in langen Jahren bisher nur einmal in einem Buchenbestand bei Marburg isolierten Art.

B. Die Bodenproben aus Abisco

Nach HARDER (1954) sind über den Standort folgende Daten anzugeben: Die Station in Schweden liegt 400 m hoch, etwa 200 km nördl. des Polarkreises auf 68° 30' nördl. Breite unter der Jahresdurchschnitts-isotherme von 0° und der Januar-Isotherme von -10°. Die Nordgrenze der Fichte verläuft weit südlich von Abisco, nur an wenigen Stellen sind vereinzelt Kiefern, sonst nur Birken in der gebirgigen, sumpfigen und seenreichen Landschaft.

1. Beim Institut, Moor unter *Cladonia*. pH 4,5.

Mort. vinacea; sonstiges Vorkommen vgl. Mex. 9.

Mort. humilis; sonstiges Vorkommen vgl. Mex. 3;

Mort. marburgensis; sonstiges Vorkommen vgl. Mex. 11;

Obige Arten waren auch sonst in sauren Böden aufgefunden worden; die pH Werte lagen bei allen 3 Arten zwischen 3,3 und 5,2 (vereinzelt höher). Von *Mort. vinacea* wurde auch eine fast weiße Form isoliert, die durch wenige Sporangienträger bedingt war; sie entsprach der fast weißen *Mort. vinacea* vom Nevado de Toluca in 3700 m Höhe. *Mort. marburgensis* war durch Einsporigkeit etwas abweichend vom Typ.

Mort. gemmifera; die von Ellis (in Fichtenwalderde, England) gefundene und beschriebene Art fand ich sonst: im Brockengarten, pH 5,0; in Fichtenstreu vom Gahrenberg b. Hann.-Münden; unter Tanne im Forêt de Valdo-Niello, etwa 1400 m, Korsika, pH 5,2; in Streu von *Pseudotsuga* aus Lonau im Harz, pH 5,2.

2. Beim Institut, stark ausgetretener Fußweg durch Moor. pH 5,8.

Mort. vinacea; siehe unter 1. bzw. Mex. 9. Es handelte sich auch hier um eine sehr helle Form.

Mort. humilis; siehe unter 1. bzw. Mex. 3;

Mort. verticillata; siehe unter Mex. 1;

Mort. elongata; sonstiges Vorkommen siehe unter Mex. 4;

Mort. zonata; diese Art habe ich sonst nur selten gefunden: in Walderde unter Kiefer-Wachholder-Tanne b. Ülzen, pH 4,5; in Fichtenwalderde, Blankenburg/Harz, pH 4,3; am Patscherkofel b. Innsbruck, oberhalb der Baumgrenze, pH 4,6; es waren also ziemlich saure Böden; vgl. auch Abisco 7.

3. Kartoffelfeld b. Soppero. pH 5,3;

Mort. hygrophila var. *minuta*; diese Varietät der formenreichsten *Mortierellen*-Art fand ich: 2mal in Kompost, pH 6,3 und 6,7; unter der Mistdecke einer Kartoffelmiete b. Hann. Münden, pH 6,6; unter *Abies alba* bei Weinheim, pH 5,0; unter *Juniperus nana* auf Muottas Muraigl, pH 5,4; unter *Larix*, auf (gedüngtem) Nadelstreu-Beet, pH 4,0; unter *Juniperus* und *Pinus silvestris* auf Sand in Hooge Veluwe/Holland, pH 5,3.

4. Kartoffelfeld Hoffsta in Själevad. pH 5,2.

Mort. alpina; sonstiges Vorkommen vgl. Mex. 12.

5. Fußweg, unter altem Pferdemit zwischen Abisco u. See. p_H 5,5.

Mort. ramanniana var. *angulispora*; sonstiges Vorkommen vgl. Mex. 12.

6. Björkliden, elektrisches Treibbeet. p_H 6,2.

Mort. alpina; sonstiges Vorkommen siehe Abisco 4 und Mex. 12. Bei den Fundorten dieser Art scheint der Kalkgehalt und die höhere Temperatur eine Rolle zu spielen.

7. Ericaceen am See. p_H 5,8.

Mort. vinacea; sonstiges Vorkommen vgl. Abisco 1 und Mex. 9.

Mort. zonata; sonstiges Vorkommen vgl. Abisco 2.

8. Paddos, Birken, Weiden, *Ericaceen*; 600 m, oberste Birkengrenze. p_H 5,5.

Mort. marburgensis; sonstiges Vorkommen siehe Abisco 1 und Mex. 11.

Mort. ramanniana var. *angulispora*; sonstiges Vorkommen siehe Mex. 12.

Mort. vinacea; sonstiges Vorkommen siehe Mex. 9.

Mort. humilis; sonstiges Vorkommen siehe Abisco 1 u. 2 und Mex. 3.

Nach HARDER (1954) liegt die Baumgrenze schon bei etwa 600 m.

9. Bei der Station, Moor, sumpfige Stelle, *Eriophorum* und Moos. p_H 6,1.

Mort. ramanniana var. *angulispora*; sonstiges Vorkommen siehe Mex. 12 sowie Abisco 5 und 8.

Zusammenfassung

Es wurden also isoliert aus *mexikanischen* *nordischen* Böden

<i>Mort. alpina</i> Peyronel	+	+
<i>Mort. elongata</i> Linn.	+	+
<i>Mort. exigua</i> Linn.	+	—
<i>Mort. gemmifera</i> Ellis	—	+
<i>Mort. humilis</i> Linn.	+	+
<i>Mort. hygrophila</i> var. <i>minuta</i> Linn.	—	+
<i>Mort. marburgensis</i> Linn.	+	+
<i>Mort. minutissima</i> Van Tieghem	+	—
<i>Mort. ramanniana</i> (Möller) Linn.	+	—
<i>Mort. ramanniana</i> var. <i>angulispora</i> (Naumov) Linn.	+	+
<i>Mort. spinosa</i> Linn.	+	—
<i>Mort. schmuckeri</i> n. sp.	+	—
<i>Mort. verrucosa</i> Linn.	+	—
<i>Mort. verticillata</i> Linn.	+	+
<i>Mort. vinacea</i> Dixon-Stewart	+	+
<i>Mort. zonata</i> Linn.	—	+

Aus 9 Erdproben aus Abisco wurden 10 verschiedene Arten isoliert, die alle schon aus deutschen und außerdeutschen Böden bekannt waren; 7 von ihnen waren auch in mexikanischen Erdproben gefunden worden.

Alle Arten der Abisco-Böden waren solche saurer Standorte, ausgenommen *Mort. alpina*, die kalkliebend und wärmeliebend bzw. -resistent zu sein scheint und bei Abisco in einem elektrischen Treibbeet wie auch in Kulturland (Kartoffel) auftrat.

Von 13 in 13 mexikanischen Erdproben aufgefundenen Arten waren 7 auch in Abisco isoliert worden, die übrigen waren bis auf die Hauptart *M. ramanniana* kalkliebend (*minutissima*, *spinosa*, *exigua*) oder seltene Arten (*verrucosa*, *schmuckeri*). Auch die in Abisco, aber nicht in Mexiko auftretenden Arten (*Mort. gemmifera* und *M. zonata*) sind seltenere Arten.

Es läßt sich aus obigen Untersuchungen also Keine geographische Gebundenheit der *Mortierellen* ableiten; vielmehr scheinen sie, im ganzen gesehen, Ubiquisten zu sein.

Die von HARDER (1954) und GAERTNER (1954) bei niederen *Phycomyceten* festgestellte Abnahme der Artenzahl und Gattungszahl vom Äquator gegen den Pol läßt sich für die *Mortierellen* nicht feststellen. Auch GAERTNER hatte den Eindruck, daß bei *Mucorineen* keine Abnahme der Artenzahl in natürlichen Böden Nordschwedens gegenüber der in afrikanischen Naturböden festzustellen war.

Obleich ich keine quantitativen Untersuchungen anstellte, hatte ich nicht den Eindruck einer auffallenden Abnahme der Artendichte in den Bodenproben von Abisco. In mehreren Böden waren sowohl mehrere Arten wie auch eine durchschnittliche Anzahl von Keimen an *Mortierellen* vorhanden. Auch konnte — entgegen den Befunden von den vorher genannten Autoren — keine auffallende Zunahme der Artenzahl in Kulturböden festgestellt werden, das Gegenteil schien eher der Fall zu sein.

Literatur

GAERTNER, A.: Über das Vorkommen niederer Erdphycomyceten in Afrika, Schweden und an einigen mitteleuropäischen Standorten. Arch. Mikrobiol. **21**, 4—56 (1954). — HARDER, R.: Über die arktische Vegetation niederer Phycomyceten. Nachr. Akad. Wiss. Göttingen. Math.-physik. Kl. II b. Biol.-physiol.chem. Abt. Nr. **1**, 1—9 (1954). — LINNEMANN, G.: Beitrag zu einer Flora der Mucorineae Marburgs. Flora **130**, 176—217 (1936). — LINNEMANN, G.: Die Mucorineen-Gattung *Mortierella* Coemans. Pflanzenforschung H. 23, Jena: Verl. G. Fischer 1941. — LINNEMANN, G.: Einige neue erdbewohnende *Mortierella*-Arten. Zbl. Bakt., II. Abt. **107**, 225—230 (1953).

Anhang

Mortierella schmuckeri n. sp.

Das Substratmycel breitet sich in kleinen bis mittelgroßen Lappen oder auch in etwa 1 cm breiten Zonen aus. Die Hyphen sind außerordentlich ölfreich. Das Luftmycel ist weiß, locker, wattig, in der Mitte etwas dichter. Die Sporangienträger erscheinen manchmal erst nach längerem Kultivieren; sie sind sehr zart, zweigen einzeln, seltener zu zweien \pm senkrecht von Lufthyphen ab; ihre Länge beträgt 20—120 μ

(maximal etwa $170\ \mu$), meist etwa $40\ \mu$, die Breite verschmälert sich von $4\text{--}5\ \mu$ an der Basis auf $1\text{--}2\ \mu$ unter dem Sporangium. Die gewöhnlich etwas flachgedrückten Sporangien sind meist 1sporig; die Sporen sind dementsprechend meist etwas oval, etwa $8\text{--}10 \times 10\text{--}15\ \mu$; anfangs befindet sich eine ansehnliche Ölkugel in ihrer Mitte, später tritt das Öl häufig aus (vgl. Abb. 1d). Gemmen sind in typischer Ausbildung nicht beobachtet worden; gemmenartige, Öl enthaltende Mycelanschwellungen

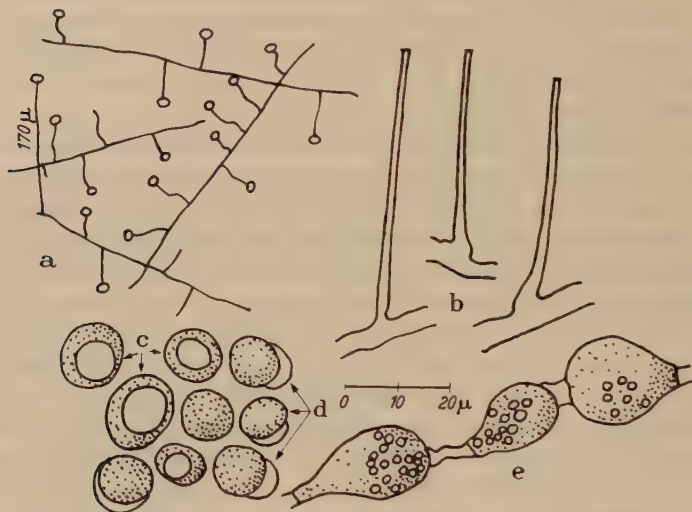


Abb. 1. *Mortierella schmuckeri* n. sp. a Sporangienträger an Lufthyphen; b Sporangienträger; c jüngere Sporen; d ältere Sporen; e gemmenartige Mycelbildungen; b—e in gleicher Vergrößerung

können gelegentlich in älteren Kulturen festgestellt werden. Zygoten wurden nicht beobachtet, wenn auch gelegentlich reichlich Anastomosen. Der Geruch ist nicht typisch, wenngleich manchmal etwas lauchartig.

Mycelio substratum induente sive diviso in mediocres vel parvos lobulos sive zonato (ca 1 cm). Hyphis uberrimis olei. Mycelio aereo albo, soluto, in medio paulum densiore. Hyphis sporangiferis initio ramosissimis, deinde frequentioribus, tenuissimis, ramis erectis ex hyphis aeriis orientibus, singulis raro binis; $20\text{--}120\ \mu$ longis (sumum ca $170\ \mu$), plerumque ca $40\ \mu$ sursum ab $4\text{--}5\ \mu$ ad $1\text{--}2\ \mu$ attenuatis. Sporangii globosis, plerumque subglobosis, monosporis; sporis adaeque plerumque subglobosis, ca $8\text{--}10 \times 10\text{--}15\ \mu$; initio magna gutta olei in medio est, deinde globuli olei saepe pro parte pullulant. Chlamydosporis typicis non observatis; tumoribus irregularibus mycelii senioris interdum observatis; Zygosporis ignotis, sed interdum multis anastomosis. Odore plerumque non typico, aliquando odore allii.

Fundort: Queretaro, Mexiko, Opuntienbestand. pH 6,7.

Die Art würde in die sectio *Alpina* zu stellen sein. Sie steht zwischen *Mort. monospora*, von der sie sich u. a. durch die oft etwas flachgedrückten Sporangien bzw. Sporen, sowie durch das Fehlen typischer Gemmen

unterscheidet, und *Mort. clausenii* n. sp., die auch vorwiegend gedrückt-kugelige, 1-sporige Sporangien, aber sehr viel kleinere und außerordentlich zahlreiche Sporangienträger hat.

Diese auffallende Art war als einzige *Mortierella* aus dieser einzigartigen Bodenprobe in mehreren Abimpfungen mehrmals isoliert worden. Ich benenne sie nach Herrn Professor Dr. TH. SCHMUCKER, Direktor des Institutes für Forstbotanik und Forstgenetik der Universität Göttingen.

Mortierella clausenii n. sp.

Das Substratmycel ist sehr schön rosettig, mit kleinen schmalen und etwas breiteren, bis etwa 1 cm langen Lappen. Die Hyphen sind in der Regel querwandlos und im Habitus durchaus mortierellenartig durch die ausgeprägte dichotome Verzweigung. Hyphenbreite 4–5 μ . Das Luftmycel ist wenig ausgebildet, normalerweise breitet es sich spinnwebig bis etwas flockig aus (infeuchteren Kulturen bei etwa 15°C war es höher, dichter und tuffartig). Der Geruch ist nicht typisch, wenngleich nicht ungewöhnlich für die Gattung. Die Hyphen sind außerordentlich öereich. Die Sporangienträger zweigen als \pm dicht-wirtelig gestellte, sehr kurze Ästchen senkrecht von langen Lufthyphen ab; Länge etwa 7–17 μ , Breite bis etwa 1 μ , im ganzen eher an Sterigmen erinnernd. Sporangien etwas flachgedrückt, nur mit einer etwa 5–6 μ großen, kugeligen bis etwas gedrückt kugeligen Spore, öfters mit größerer Ölkugel. Durch austretendes Öl wird der Umriß der Spore manchmal unregelmäßig. Eine Verzweigung konnte bei den Trägern nie beobachtet werden. Gemmen sind in typischer Ausbildung nicht vorhanden, jedoch sind Hyphenanschwellungen in Gestalt rhizoidenartiger Mycelverästelungen häufiger. Zygoten und Anastomosen unbekannt.

Mycelio substratum induente rosatim dispositis lobulis parvis, angustioribus et latoribus, ca 1 cm longis. Hyphis substrati sine saeptis, distincte furcatis, 4–5 μ crassis. Mycelio aërio vix substratum tegente, soluto, subflocculoso, interdum altiore et densiore. Odore non typico, sed non irregulari. Hyphis uberrimis olei. Hyphis sporangiferis simplicibus, minutissimis, \pm dense verticillatis et erectis ex hyphis aëriis orientibus, ca 7–17 μ longis, ad 1 μ crassis. Sporangii subglobosis, monosporis. Sporis subglobosis, interdum magna gutta olei praeditis, 5–6 μ . Minuti globuli olei interdum de sporis pullulant. Chlamydosporis typicis non observatis; tumoribus rhizoidibus mycelii crebris. Zygosporis et anastomosis ignotis.

Fundort: In Erde aus einem Castanetum, Nordhang, 300 m, Cavigliano dentovalli, 300 m, Tessin. pH 4,7.

Die Erdprobe wurde mir liebenswürdigerweise im Herbst 1954 von Herrn Prof. Dr. SCHMUCKER mitgebracht. Ich benenne sie nach meinem hochverehrten Betreuer in meinen ersten mycologischen Arbeiten. Herrn Prof. Dr. CLAUSSEN.

Die Form ist so auffallend, daß sie nicht den Eindruck einer *Mortierella* erweckt, wenngleich einer *Mortierellacee*. Jedoch ist sie nicht *Haplosporangium*, an welche Gattung sie durchaus erinnert. Die Ursprungs-

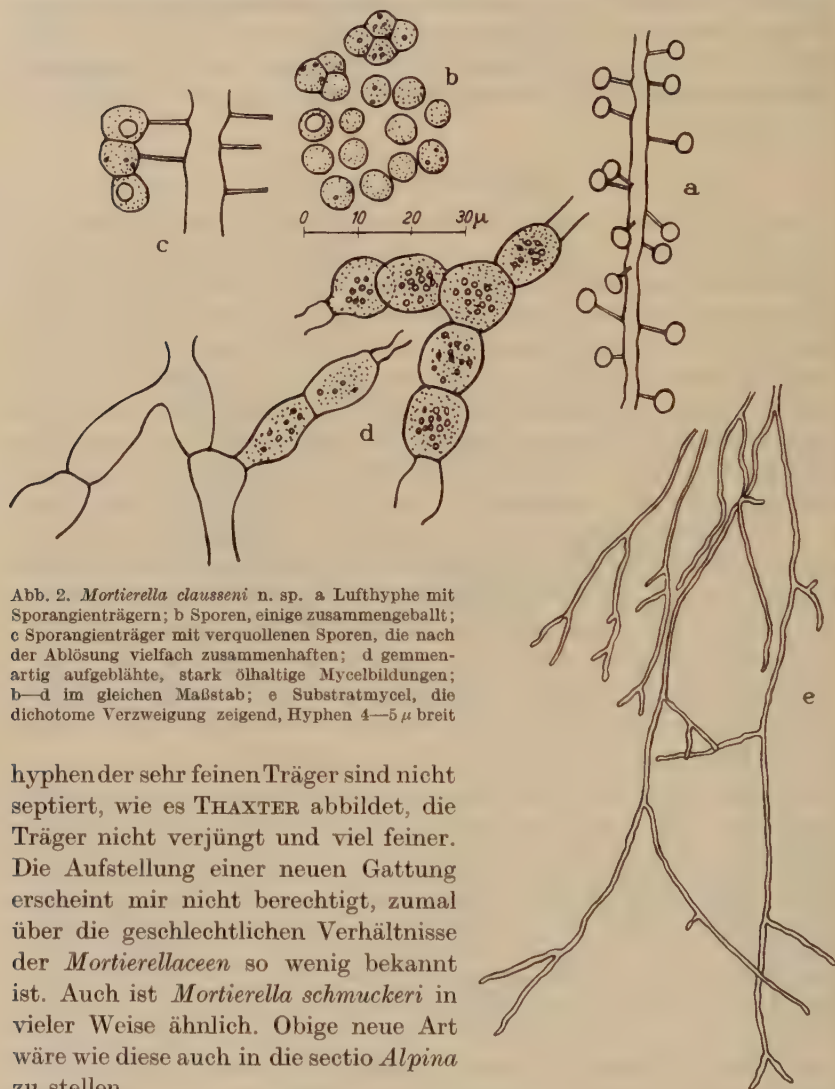


Abb. 2. *Mortierella clausseni* n. sp. a Lufthyphie mit Sporangienträgern; b Sporen, einige zusammengeballt; c Sporangienträger mit verquollenen Sporen, die nach der Ablösung vielfach zusammenhaften; d gemmenartig aufgeblähte, stark ölhaltige Mycelbildungen; b—d im gleichen Maßstab; e Substratmycel, die dichotome Verzweigung zeigend, Hyphen 4—5 μ breit

hyphen der sehr feinen Träger sind nicht septiert, wie es THAXTER abbildet, die Träger nicht verjüngt und viel feiner. Die Aufstellung einer neuen Gattung erscheint mir nicht berechtigt, zumal über die geschlechtlichen Verhältnisse der *Mortierellaceen* so wenig bekannt ist. Auch ist *Mortierella schmuckeri* in vieler Weise ähnlich. Obige neue Art wäre wie diese auch in die sectio *Alpina* zu stellen.

Mort. hygrophila var. *rosularis* n. var.

Substratmycel kleinlappig-rosettig, z. T. fast strahlig. Luftmycel fein, gleichmäßig, ziemlich dicht. Hyphen 6—7 μ breit, außerordentlich öleich. Geruch meist nicht typisch, nur manchmal schwach typisch.

Sporangienträger gewöhnlich zerstreut und hinfällig, etwa zwischen 150 und 430 μ hoch, meist niedrig. Verzweigung sympodial, häufig nur 1—2 Äste. Sporangien wenigsporig, etwa 20—25 μ im Durchmesser. Sporen meist kurzoval, seltener halbseitig abgeflacht oder auch \pm kugelig, etwa zwischen 7,5 und 14 μ , häufig mit zentraler Ölkugel. Gemmen und Zygoten nicht beobachtet.

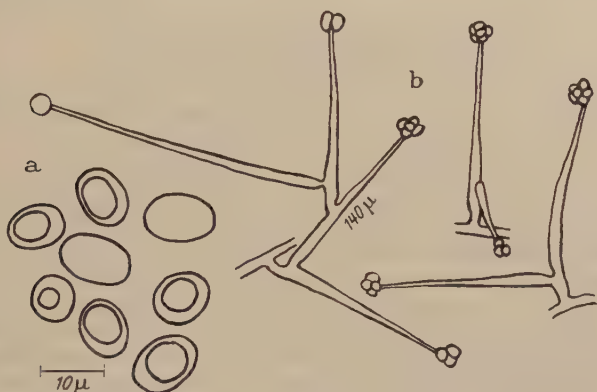


Abb. 3. *Mortierella hygrophila* var. *rosularis* n. var. a Sporen; b Sporangienträger

Mycelio substratum induente lobulis parvis, rosularibus, interdum subradiosis. Mycelio aerio tenue, aequale, sat denso. Hyphis 6—7 μ , uberrimis olei. Odore plerumque non typico, interdum paulum typico. Hyphis sporangiferis fere dispersis et exilibus, ca 150—430 μ longis, plerumque minutis. Sympodialiter ramosis, saepe tantum 1—2 ramis praeditis. Sporangii oligosporis, ca 20—25 μ diam. Sporis subglobosis, raro subangulatis vel \pm globosis, ca 7,5—14 μ , saepe gutta olei munitis. Clamydosporis et zygosporis ignotis.

Fundort: Gorner Alm, in 2300 m Höhe, N-Hang, an der Arven-Lärchen-Baumgrenze. pH 5,6.

Das auffallend rosettig ausgebildete Mycel ist für die typische *Mort. hygrophila* ungewöhnlich; der meist fehlende typische Geruch, die fehlenden Gemmen und die Zartheit der Träger unterstreichen gleichfalls die Abweichung von der Hauptform.

(Aus dem Botanischen Institut der Universität Rostock)

Kulturversuche mit *Peronospora brassicae* Gäum.

Von

H. V. GUTTENBERG und H. SCHMOLLER

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 24. März 1958)

Bisher ist es nicht gelungen, Vertreter der Oomycetengattungen *Peronospora*, *Pseudoperonospora*, *Plasmopara*, *Albugo* und *Bremia* auf Nährböden oder in Nährlösungen zu kultivieren.

Bei den Bemühungen, von Conidien ausgehend, Mycel durch saprophytische Ernährung zu erhalten, wurde bei *Peronospora effusa* in sehr verdünnter Bierwürze mit freier Phosphorsäure lediglich Verzweigung des Keimschlauchs erzielt (BÜSGEN 1893). Die Versuche mit *Plasmopara viticola* (ARENS 1929) und *Bremia lactucae* (SCHULZ 1937) schlugen völlig fehl. MOREL (1948) legte mit *Plasmopara viticola* infizierte Blattstückchen auf Schopfer- und Köglagar, denen Pilzwachsstoffe wie Aneurin, Nicotinsäure, Pyridoxin, Biotin, d-Pantothensäure in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt worden waren. Es konnte jedoch in keinem Falle erreicht werden, daß das Mycel aus dem natürlichen in das künstliche Medium überging.

Die genannten Peronosporeen wachsen in den Wirtspflanzen interzellulär oder, wenn sie Gefäße befallen, intrazellulär (KLEBAHN 1929). Sie entziehen mit Haustorien den lebenden Protoplasten die Nährstoffe. Im Vergleich zu dem nahe verwandten Oomyceten *Phytophthora infestans* ist ihr Parasitismus ausgeprägter. GÄUMANN (1949) schreibt hierüber: „Mit steigender morphologischer Differenzierung wächst auch das Ausmaß der parasitischen Verfeinerung. *Pythium* und *Phytophthora* töten das Wirtsgewebe; die höchsten *Peronospora*-Arten stimulieren es dagegen zu Deformationen und Wucherungen. *Pythium* und *Phytophthora* sind fakultative Parasiten und lassen sich auf künstlichen Substraten kultivieren; die höchsten Peronosporeen, *Plasmopara* und *Peronospora*, sind obligate Parasiten und gedeihen auf totem Substrat nicht mehr.“ Es ist gewiß, daß nicht nur die genannten Autoren Versuche zur saprophytischen Kultur dieser Parasiten unternommen haben. Jedoch wurden solche Arbeiten wegen des völlig negativen Verlaufs nur selten in Veröffentlichungen erwähnt. Da es nicht möglich war, diese anspruchsvollen Pilze ohne ihre Wirte zu ernähren, wurde infiziertes Wirtsgewebe kultiviert. Solche Versuche wurden mit *Plasmopara viticola* durchgeführt (MOREL 1944). Wie auf Blättern entwickelten sich auch auf beimpftem Gewebecallus nach der Inkubationszeit Conidienträger. Das Mycel blieb jedoch fast vollständig innen und ließ sich nicht isolieren. Die geschlechtliche Fortpflanzungsform war nie an den vereinzelt Hyphen außerhalb des Gewebes zu finden. Der Pilz drang auch nicht aus dem Gewebe in den Nähragar vor, und bei seiner fortbestehenden endoparasitischen Lebensweise ließen sich keine weiteren ernährungsphysiologischen Untersuchungen anstellen.

Wegen der vorliegenden unbefriedigenden Ergebnisse setzten wir die Bemühungen zur Kultur einer obligat parasitären *Peronosporae* fort und wählten für unsere Versuche *Peronospora brassicae* Gäum. aus. Gegenüber *Peronospora sisymbrii sophiae* Gäum. und *Peronospora parasitica* Gäum., mit denen ebenfalls orientierende Vorversuche gemacht wurden, wies dieser Pilz verschiedene Vorzüge auf, die später erörtert werden.

A. Biologie des Pilzes

Seit den Untersuchungen GÄUMANNs (1918) wird die auf Kohlgewächsen parasitierende *Peronospora* als *Peronospora brassicae* bezeichnet. Man findet in der Literatur häufig auch den älteren Namen *Peronospora parasitica*, den manche Autoren wegen der Unsicherheit der morphologischen Unterscheidung der 1918 neu aufgestellten Kleinarten beibehalten. Den entsprechenden Wirten ordnen sie physiologische Rassen zu (WEBER 1932, WALKER 1957 u.a.).

Die Conidien des Pilzes keimen bei vorhandener Feuchtigkeit mit Keimschläuchen, welche entweder durch die Epidermis oder aber durch die Spaltöffnungen in den Wirt eindringen (FISCHER u. GÄUMANN 1929). Das Ausmaß der Infektion ist vom Entwicklungszustand und der Nährstoffversorgung der Pflanze abhängig. Junges Gewebe wird leicht angegriffen und bietet dem Pilz gute Ausbreitungsmöglichkeit (MAGNUS 1894). In höheren Nährstoffkonzentrationen gezogene Pflänzchen werden stärker befallen als solche, die in Verdünnungsstufen heranwachsen. Während P- und S-Mangel bei guter Entwicklung des Pilzes nur auf das Wachstum der Pflanzen stark hemmend wirken, tritt bei Fehlen von N oder K in den Nährlösungen auch vermindertes Wachstum des Pilzes ein (FELTON u. WALKER 1946). Nach Ablauf der Inkubationszeit treten aus den Spaltöffnungen die Conidienträger zu mehreren in einer Gruppe hervor. Sie sind stark hygroskopisch. Bei verminderter Luftfeuchtigkeit tordieren sie und schleudern dabei die Conidien fort (PINCKARD 1942), für deren Abtrennung das aus wasserlöslichen Stoffen bestehende Sterigma von Bedeutung ist (ZALEWSKI 1883, ROSTOWZEW 1903). Als Hauptfruchtform werden in der Wirtspflanze Oogonien gebildet, denen sich jeweils ein Antheridium anlegt. Der Protoplast des Oogoniums differenziert sich dann in das einkernige zentrale Ooplasma und das umgebende vielkernige Periplasma (WAGER 1900). Letzteres wird zum Aufbau der Oosporenmembran verbraucht. Die widerstandsfähigen Oosporen überdauern ungünstige Bedingungen. Nach einer Ruheperiode keimen sie mit einem Keimschlauch aus, der sich direkt zum Mycel weiterentwickelt.

Als Erreger des falschen Mehltaus der Kohlgewächse ist *Peronospora brassicae* weit verbreitet, verursacht der Landwirtschaft jedoch keinen größeren Schaden, da an ausgewachsenen Pflanzen nur die unteren, älteren Blätter durch den Befall vorzeitig vergilben und abfallen. Tritt der Pilz aber an Keimpflänzchen auf, so greift die Infektion schnell um sich und führt zu erheblichen Verlusten, indem durch sie Prädisposition für den Befall mit fakultativen Parasiten geschaffen wird (EDDINS 1943). Aus gleichem Grunde können infizierte ausgewachsene Pflanzen nicht so lange gelagert werden wie gesunde (RAMSEY 1935).

Der Temperatur und der Luftfeuchtigkeit kommen für die Ausbreitung der Krankheit große Bedeutung zu. Bei hoher Luftfeuchtigkeit und 23°C wird die Entwicklung von der Infektion bis zur Conidienträgerbildung in 3 Tagen durchlaufen. Die Inkubationszeit wird bei Temperaturen von 8° bis 16°C verlängert, jedoch ist

die Fruktifikation dann stärker. Die Conidien keimen auf der Pflanze am schnellsten bei 12°C (bereits nach 1½ Stunden). Das Optimum der Bildung von Appressorien, des Eindringens in die Pflanze und der Haustorienbildung liegt bei 16°C. Für die Mycelausbreitung im Wirtsgewebe erweisen sich 16—20°C als günstig. Sporulation und Reinfektion finden im Temperaturbereich von 24° bis 28°C nur noch in geringem Maße statt (FELTON u. WALKER 1946). So wird verständlich, daß verhältnismäßig niedrige Temperaturen und zeitweilig hohe Feuchtigkeit die Ausbreitung der Krankheit begünstigen. Die Neuinfektion junger Pflänzchen im Frühjahr kann durch auskeimende Oosporen erfolgen, die dem Samen anhafteten (CHUPP 1925). Aus überwintertem Mycel entstehen ebenfalls Infektionsherde (THUNG 1926), wie es auch für andere *Peronospora*-Arten festgestellt wurde (MAGNUS 1887, MELHUS 1915), und das Auffinden von Mycel im Samen von Kohlgewächsen zeigt einen weiteren Weg, der zur Infektion junger Pflänzchen führen kann (KUPIRIANOWA 1957).

B. Material und Methodik

Für Kulturversuche ist es eine wichtige Voraussetzung, daß Pilzconidien stets ausreichend vorhanden sind. Infektionen der zugehörigen Keimpflanzen mit *Peronospora*-Arten gelingen leicht und mit *Brassica napus* var. *esculenta* hatten wir eine Wirtspflanze gewählt, deren Samen leicht zu beschaffen sind und schnell auskeimen.

Mit *Peronospora brassicae* Gäum. infizierte Blätter der Kohlrübe (*Brassica napus* var. *esculenta*) wurden im Oktober 1956 von einem Feld abgenommen, das überaus stark befallen war. An älteren, vergilbten Spreiten, nie an kräftigen grünen waren Conidienträger festzustellen. Die Blätter wurden gereinigt, in feuchte Kammern gelegt und die bereits am nächsten Tage neu gebildeten Conidien in Wasser abgeschüttelt. Eine so gewonnene Sporensuspension wurde mit dem Zerstäuber auf die Cotyledonen herangezogener Wirtspflanzen gesprüht. Die für die Keimschlauchbildung notwendige Feuchtigkeit wurde durch eine übergestülpte Glasglocke (8 Std) erhalten. Nach 4 Tagen erschienen bei Gewächshaustemperaturen um 20°C an Ober- und Unterseite der großen Cotyledonen dichte Conidienträgerrasen, wenn man über die Pflanzen für etwa 12 Std eine mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Glasglocke setzte. Ebenso gelangen die Infektionen an den anderen Wirtspflanzen (GÄUMANN 1927) *Brassica rapa* und *Brassica oleracea*. Es konnten unter gleichen Bedingungen auf *Raphanus sativus*-, *Sinapis alba*- und *Sinapis arvensis*-Cotyledonen nach der Inkubationszeit keine Conidienträgerrasen festgestellt werden.

Conidien, welche auf die Nährsubstrate zu übertragen waren, mußten möglichst keimfrei sein. Aus diesem Grunde wurden die infizierten und in gedämpfter Erde herangezogenen Kohlrübenpflänzchen nach fast abgelaufener Inkubationszeit gebündelt abgeschnitten, in einer Lösung von 0,2% Sublimat und 0,1% Saponin eine Minute lang desinfiziert, danach mehrmals in keimfreier Aqua dest. gespült und in sterile Kammern gelegt. Hier bildeten sich in etwa 18 Std bei 16—18°C reichlich Conidien, die durch Abtupfen auf die Nährmedien übertragen wurden. Die Blätter konnten dann noch ein zweites Mal in feuchte Kammern gelegt und die entstandenen Conidien für die Infektion weiterer Pflänzchen verwendet werden.

Nährlösungen und Agarnährböden wurden 3 mal mit Intervallen von 24 Std je 20 min lang im Dampftopf sterilisiert. Als Kulturgefäße dienten 100 cm³ Erlenmeyerkölbchen und Petrischalen von 9 cm Ø. Nicht heiß sterilisierte keimfreie Pflanzenpreßsäfte wurden mit einem Jenaer Ganzglasbakterienfilter hergestellt. Es wurden jeweils 20 Schalen oder Kölbchen mit einem Nährmedium ange-setzt und beimpft.

C. Kulturversuche

I. Conidien und infizierte Blätter als Ausgangsmaterial

Die Keimung von Conidien wird physiologisch durch ihre Überführung aus dem Stadium niederer in hohe Stoffwechselaktivität charakterisiert (GOTTLIEB 1950). Hierzu bedarf es außer günstiger Temperatur- und pH-Bedingung bei *Peronospora brassicae* des Wassers und wie UPPAL (1926) für *Peronospora parasitica* feststellte, des Sauerstoffs. Für die Vermehrung des Protoplasmas bei der Weiterentwicklung des Keimschlauchs zu Mycel sind dann Stoffe notwendig, deren Zusammenstellung bisher nicht gelang. Bei eigenen mikroskopischen Untersuchungen von Conidien, die auf den Kotyledonen der Wirtspflanze ausgekeimt waren, konnte allerdings in Einzelfällen festgestellt werden, daß sich Keimschläuche verzweigt hatten, bevor ein parasitisches Verhältnis zu subcutikularen Zellagen bestand. Da die Übertragung verzweigter Keimschläuche auf Nährböden ohne stärkere Verunreinigung nicht möglich war, wurde der Versuch unternommen, die Verzweigung auf mit Sporen beschickten Agarplatten zu erzielen. Es wurden verwendet:

a) Schopferagar (SCHOPFER 1949); Glucose 2%; Asparagin 0,1%; MgSO_4 0,05%; KH_2PO_4 0,15%. — b) Schopferagar mit Zusätzen von 10 γ , 100 γ , 1 mg, 10 mg Aneurin je Liter. — c) Keimpflanzendekoktagar: 300 g Kohlrübenpflänzchen (Stengel und Kotyledonen) wurden zerrieben, mit 300 cm³ Aqua dest. aufgekocht, choliert, nach Auflösen von 1,8% Agar und 0,5% Glucose filtriert und im Dampftopf fraktioniert sterilisiert. — d) Kotyledonendekoktagar: Bei Verwendung von 250 g Kohlrübenkotyledonen und 250 cm³ Aqua dest. mit Agar- und Glucosezusatz wie Keimpflanzendekoktagar hergestellt. — e) Stengeldekoktagar: Aus 250 g Stengeln von Kohlrübenkeimpflänzchen wie Kotyledonendekoktagar. — Von c, d und e wurden auch Gemische mit Schopferagar bereitet, und zwar Schopferagar/Dekoktagar im Verhältnis 1 : 2, 1 : 1 und 1 : $\frac{1}{4}$. Auf allen Agarplatten wurde vor dem Beimpfen mit Conidien ein Tropfen sterile Aqua dest. ausgespatelt. — f) Bierwürzeagar: Bierwürzeanteil 0,125%; KH_2PO_4 0,1%; Agar 1,8%.

Die Keimschläuche hatten auf den verschiedenen Nährböden unterschiedliche Länge. Auf Schopfer-/Stengeldekoktagar 1 : 1 waren sie 2 mal so lang wie auf Schopfer-/Kotyledonendekoktagar 1 : 1 nach der gleichen Zeit und unter gleichen Versuchsbedingungen. Nur auf Bierwürzeagar fanden sich einige Verzweigungen, jedoch ging auch hier die Entwicklung nicht voran.

Um Mycelwachstum zu erzielen, wurden des weiteren in diese Nährböden infizierte Kotyledonen der Wirtspflanze gedrückt, die zuvor an ihrer Oberfläche desinfiziert worden waren. Auf denjenigen Teilen der Blätter, die aus dem Agar hervorragten, bildeten sich zwar Conidienträger, aber nur in einem Falle, und zwar auf Schopfer-/Pflanzendekoktagar 1 : $\frac{1}{4}$, konnte beobachtet werden, daß ein Mycelfaden aus dem Blatt in den Agar vordrang. Die Hyphe verzweigte sich und stellte dann ihr Wachstum ein.

Nach diesen Mißerfolgen wurde die Entwicklung der Conidien auf Kohlrübgengereibsel mikroskopisch verfolgt. Es kam hier nicht nur zur Keimung, sondern das Wachstum konnte bis zur Mycelbildung beobachtet werden. Nach 3 Std (20°C) war der größte Teil der Conidien ausgekeimt. Oft wurde dabei für den Keimschlauch keine besondere Austrittsstelle gebildet, sondern die Conidien verformten sich stark und gin-



Abb. 1. Skizzen der Conidienkeimung in Kohlrübgengereibsel

gen kontinuierlich in die erste Hyphe über (Abb. 1, 1, 2). Bald kam es zu Verzweigungen (Abb. 1, 3, 4, 5) und häufig fand sich an der dem ersten Keimschlauch gegenüberliegenden Seite eine weitere Ausstülpung, die auch mycelartig weiterwachsen konnte (1, 6, 7, 8). Obwohl die Kohlrüben vor dem Zerreiben sorgfältig gereinigt und mit Sublimat/Saponin vor dem Schalen desinfiziert worden waren, entwickelten sich im Gereibsel Actinomyceten und es erschien schwierig, die kleinen Mycelstückchen von *Peronospora brassicae* rein auf Nährböden zu übertragen.

Eine weit einfachere Möglichkeit, Mycel des Pilzes zu isolieren, ergab sich mit der Infektion von Kohlrübenscheiben. Kohlrüben wurden in lauwarmem Wasser sorgfältig gereinigt, in eine Lösung von 0,2% Sublimat und 0,1% Saponin zur Desinfektion gelegt (1 Std.), in steriler

Aqua dest. abgespült und mit keimfreien Messern geschält und zerschnitten. Die in sterile Petrischalen gelegten Scheiben wurden mit Conidienträgerrasen (s. S. 270) ohne Zugabe von Wasser betupft. Nach der üblichen Inkubationszeit (4—5 Tage) erschienen Conidienträger, und 4 Tage danach begann sich Luftmycel zu entwickeln (Abb. 2). Innerhalb einer weiteren Woche waren Mycelflöckchen von 3—4 mm ϕ herangewachsen, die mit schmaler Basis der Kohlrübenscheibe aufsaßen und sich mit einer Impfnadel einzeln gut abheben ließen (Abb. 3). Bei der für das Mycelwachstum günstigen Temperatur von $19\text{--}20^{\circ}\text{C}$ war die Conidienträgerentwicklung am Luftmycel spärlich, ja oft traten keine Fruktifikationsorgane auf. Wurden die Petrischalen jedoch für 24 Std niederer Temperatur ausgesetzt (7°C), so war sie überaus reichlich. Abb. 4 zeigt Luftmycel mit einem Conidienträger. Zwischen Trägerästen und Conidien

fehlte oft das Sterigma, was an der Plasmabewegung zwischen ihnen zu erkennen war. Die Conidien waren dann zuweilen birnförmig und keimten aus, ohne abgeschleudert zu werden (Abb. 5). Es kam auch vor, daß bei ihrer Keimung ein conidenträgerähnlicher Keimschlauch entstand, an dessen Verzweigungen sich Sekundärconidien bildeten (Abb. 6). Riß eine abweichend geformte Conidie ab, so entwickelte sie sich normal weiter (Abb. 7).

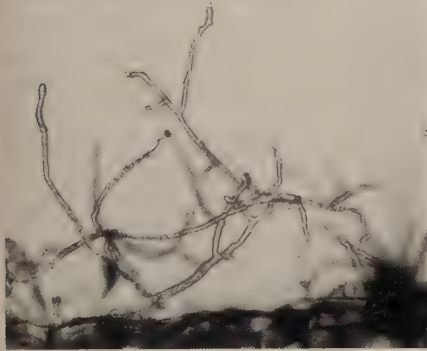


Abb. 2. Beginn der Luftmycelentwicklung auf einer Kohlrübenscheibe (Freihandschnitt)

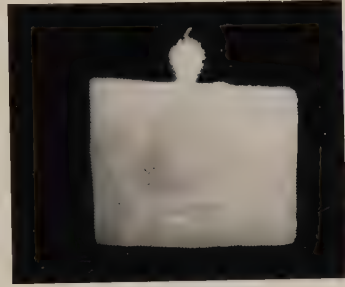


Abb. 3. Luftmycel auf Rübenscheibe 2 Wochen nach dem Beimpfen

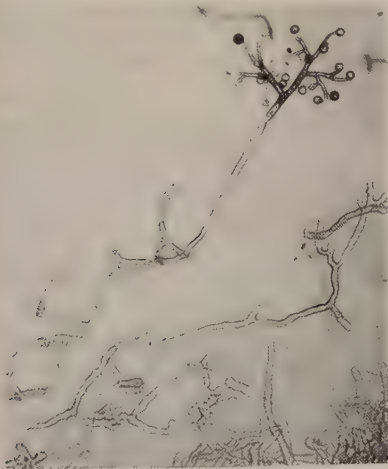


Abb. 4. Luftmycel mit Conidenträger

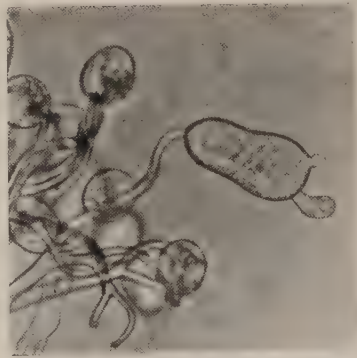


Abb. 5.
Am Trägerast ausgekeimte birnförmige Conidie

Auch die geschlechtliche Propagationsform des Pilzes fand sich im Luftmycel. 3—4 Wochen alte Mycelflöckchen enthielten Oogonien mit anliegenden Antheridien (Abb. 8), sowie alle Entwicklungsstadien bis zur Oospore (Abb. 10). Von ihnen sei hier die Differenzierung in das zentrale Ooplasma und das umgebende Periplasma abgebildet (Abb. 9). Die

Luftmycelentwicklung war auf Kohlrüben, welche im Oktober 1956 in ein Gewächshaus (Kalthaus) umgepflanzt worden waren, am besten, wenn deren Scheiben in den Monaten Januar bis März 1957 beimpft wurden. Auf jungen Kohlrüben war die Luftmycelentwicklung spärlicher,

und bei alten verunreinigten Bakterien und saprophytische Pilze die Kulturen. Heiß sterilisierte Kohlrübenscheiben waren für die Kultur des Pilzes ungeeignet. Es wurden auch Kohlrabi- und Radiesscheiben



Abb. 6. Bildung von Sekundärconidien



Abb. 7. Abweichend geformte keimende Conidie

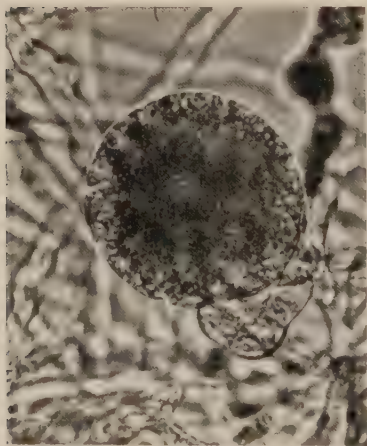


Abb. 8.
Oogonium mit anliegendem Antheridium

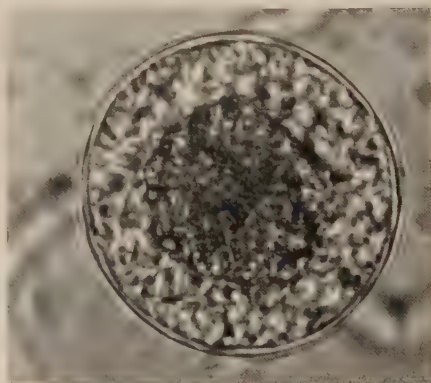


Abb. 9. Abschluß der Differenzierung in zentrales Ooplasma und umgebendes Periplasma

mit Conidien von *Peronospora brassicae* infiziert und nur bei ersteren geringe Luftmycelentwicklung mit Oosporenbildung festgestellt. Auf Radiesscheiben kam es auch nicht zur Conidienträgerbildung, wie sie v. BECK (1899) erhalten hatte.

II. Kulturversuche mit *Mycel* als Ausgangsmaterial

Nachdem die Kultur von *Peronospora brassicae* auf Kohlrübenscheiben gelungen war, boten sich für Versuche auf anderen Medien neue Möglichkeiten. Nun ließ sich die direkte Wirkung verschiedener Substrate auf das Mycelwachstum feststellen.

Zunächst wurde die Weiterentwicklung in keimfreiem Preßsaft der Wirtspflanze beobachtet. Kohlrüben wurden in lauwarmem Wasser gewaschen, geschält, mit einer Perlonreibe zerkleinert und ausgepresst. Die Flüssigkeit wurde durch eine G 3 Fritte und anschließend durch ein Jenaer Ganzglasbakterienfilter geschickt. In 100 cm³ Erlenmeyerkölbchen mit 1, 5 und 10 cm³ war bei 20° C submerse Mycelausbreitung festzustellen (Abb. 11). Die Hyphen des Luftmycels setzten in diesem Medium ihr Wachstum mit dünneren Mycelfäden fort. Nach dem 3. Tage war die Ausbreitung bereits mit dem bloßen Auge zu erkennen, ging dann jedoch nicht weiter voran. Eine gelbliche Verfärbung des vordem farblosen Preßsaftes war eingetreten, und die chemische Instabilität dieses nicht in der Hitze sterilisierten Mediums dürfte zur Einstellung des Wachstums geführt haben. In der ätherischen und der wäßrigen Phase des Preßsaftes konnte keine Mycelausbreitung beobachtet werden.

Nunmehr stellten wir uns einen Kohlrübendekoktagar in folgender Weise her: 150 g Kohlrübenscheiben (Trockengewichtsbestimmung ergab Werte zwischen 9 und 11%) wurden mit 1 l Aqua dest. 45 min lang im Dampftopf gekocht, dann dekantiert und die Scheiben ausgepresst, mit Aqua dest. wieder zu 1 l aufgefüllt und filtriert. 1,8% Agar wurden zugesetzt und nach mehrstündigem Quellen unter Zusatz von 0,5%

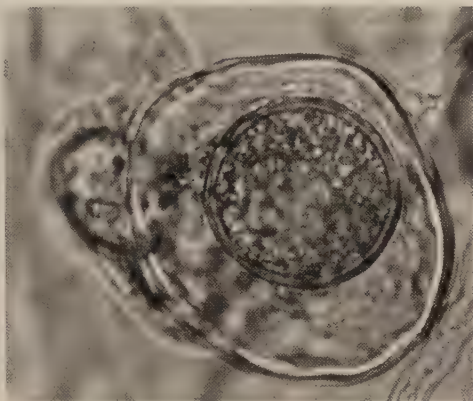


Abb. 10. Oospore von *Peronospora brassicae*

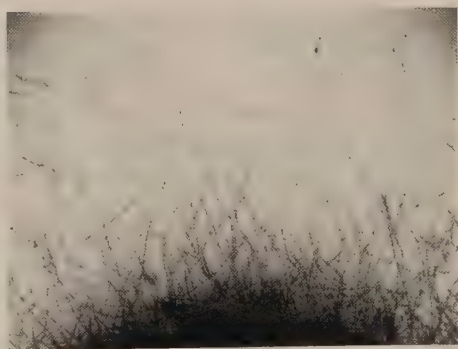


Abb. 11.
Wuchsform des *Peronospora*-Mycels Nährlösung

Glucose gekocht, danach durch Wattefilter filtriert und schließlich fraktioniert sterilisiert (p_H 5,7). Auf diesen Nährboden aufgesetztes Luftmycel drang in den Agar vor und es kam nach begrenzter Mycelausbreitung zur Conidienträger- und Sporenbildung an den Hyphen außerhalb des Nährbodens. *Damit war es gelungen, die Fruktifikation auf einem toten Substrat, also saprophytisch zu erreichen.* Das erweckte die Hoffnung eines Erfolgs auch bei Verwendung synthetischer Medien (vgl. LILLY u. BARNETT, 1951). Das Ergebnis war indessen gering. Es sei nur summarisch bemerkt, daß wir zunächst Dekokte von Roggen, Weizen und Erbsen mit Zusatz von Glucose in Lösung und in Agar verwendeten, ferner Biomalz- und Sabouraud-Agar (beide nach JANKE 1946), auch ein Caseinhydrolysatmedium mit anorganischen Komponenten¹, ohne ein Mycelwachstum zu erzielen. Anschließend versuchten wir es, gleichfalls mit negativem Ergebnis, mit Aminosäuregemischen. Geringe Mycelausbreitung erzielten wir mit Schopfer-Stengeldekoktagar 1:1, Kohlrübensamen-Glucose-Agar und Maisdekokt-Glucose-Agar. Reicheres Wachstum erfolgte jedoch in Bierwürze-Phosphat-Agar (Bierwürzeanteile waren 2%, 1%, 0,5%, 0,25%, 0,125% und 0,0625%, KH_2PO_4 -Gehalt 0,1%). Mit einer Konzentration von 2% Bierwürze wurden gute Ergebnisse erzielt. An den Enden mancher vordringenden Hyphen traten Ansätze zur Bildung von Conidienträgern im Agar auf, und baumförmige Verzweigungen waren zu erkennen. Die einen Seitenäste zeigten Conidienbildung, andere wieder wuchsen hyphenartig weiter. Außerhalb des Agars erfolgte an den Hyphen ebenfalls Fruktifikation. Einen ähnlichen, aber geringeren Erfolg hatten wir nur noch mit Hafermehlagar (2%) und Reisstärkeagar.

D. Diskussion

Die Kultur parasitischer Pilze, deren Entwicklungszyklus ohne eine saprophytische Phase verläuft, bereitet besondere Schwierigkeiten. Conidien von *Peronospora brassicae* keimen zwar in Feuchtigkeit auf Nährböden, entwickeln sich jedoch nicht zu Mycel. Aus infizierten Blättern wachsen die Hyphen nur wenig in ein künstliches Medium. Da die Lebensfähigkeit obligater Parasiten an das Vorhandensein von Stoffen gebunden ist, die bisher nur mit der lebenden Wirtszelle geboten werden können, haben MOREL u. GAUTHERT (1947) empfohlen, kultiviertes Wirtsgewebe als Substrat zu verwenden. Mit dieser Methode erhielten BAUCH u. SIMON (1957) Luftmycel von *Puccinia tartarica* auf *Mulgedium*-Callus (vgl. auch CONSTABEL, 1957).

Peronospora brassicae ließ sich auf Kohlrübenscheiben kultivieren. Dabei wurde außerhalb des Wirtsgewebes ein reiches Luftmycel gebildet.

¹ Herrn Dr. HENNIGER vom Akademiejnstitut Gr. Lüsewitz sei für die Rezeptur seines anorganischen Grundmediums vielmals gedankt.

Dieses erzeugte zunächst *Conidienträger*, wobei es auch vorkam, daß sich aus einer nicht abfallenden Conidie ein sekundärer Träger entwickelte. Ferner bildeten sich außerhalb der Unterlage *Oogonien*, *Antheridien* und nach normaler Befruchtung *Oosporen*. Für die Bildung der Fortpflanzungsorgane ist also die Einhüllung der Hyphen in der Wirtspflanze nicht Bedingung, aber die Ernährung des Mycels war immer noch eine parasitische. Die Isolierung des Luftmycels gestattete, umfangreiche Versuche zur saprophytischen Kultur anzuschließen. Bisher ist es lediglich HOTSON u. CUTTER (1951) gelungen, einen obligaten Parasiten saprophytisch zu kultivieren: Nachdem *Gymnosporangium juniperi-virginianae* einige Monate in Gewebekultur gewachsen war, entstand in einem Falle eine physiologische Mutante des Pilzes, die ihre obligat parasitäre Lebensweise aufgab und in den Nähragar vordrang. Sie wuchs auch auf zahlreichen anderen Medien und war bis auf Biotin wuchsstoffautotroph (CUTTER 1951). Wenngleich Reinfektionsversuche zeigten, daß die Fähigkeit zur parasitischen Lebensweise erhalten blieb, gibt die Kultur von Mutanten keinen Einblick in die wirklichen Nahrungsansprüche des Pilzes.

Wir bemühten uns, ein komplexes Nährsubstrat für *Peronospora brassicae* zu finden, um dann genauere ernährungsphysiologische Untersuchungen anschließen zu können. In keimfreiem Kohlrübenpreßsaft erfolgte beschränktes Wachstum bei veränderter Wuchsform, doch wurden keine Conidienträger gebildet. Leider erwies sich dieses Substrat als an der Luft instabil, was schon an einer Verfärbung zu erkennen war. Vermutlich ist das die einzige Ursache, die zur Einstellung des Wachstums führte und so auch die Conidienträgerbildung verhinderte. Nunmehr wurde heiß sterilisierter Preßsaft mit Glucose und Agar als Nährsubstrat verwendet. Damit hatten wir Erfolg. Das Mycel drang in den Nährboden ein und bildete aus Lufthyphen Conidienträger. *Damit war erwiesen, daß dies auch ohne Wirtspflanze, also in saprophytischer Kultur möglich ist.* Man könnte einwenden, daß die Conidienbildung auf Grund von Stoffen erfolgte, die bereits das Impfmycel besaß. Das kann indessen nicht zutreffen, da in vielen anderen Substraten, die in gleicher Weise beschickt worden waren, keine weitere Mycel- oder auch Conidienbildung eintrat. Positiven Erfolg hatten wir nur noch mit Reisstärkeagar, Hafermehlagar und besonders mit Bierwürze-Phosphat-Agar. Bei der Reisstärke ist zu bedenken, daß sie keinesfalls als chemisch rein betrachtet werden kann, sondern sicher noch Wirkstoff- und vielleicht auch Eiweißreste enthält. Mit mannigfach variierten synthetischen Substraten war niemals ein Erfolg zu erzielen, nicht einmal einfaches Mycelwachstum. Für das Wachstum von *Peronospora brassicae* sind also nicht nur die üblichen Nährstoffe notwendig, die mit komplexen Medien am besten geboten werden. Der Pilz benötigt außerdem eine oder

mehrere Substanzen, die sehr labil sind. Im frischen Preßsaft der Wirtspflanze sind sie nur kurze Zeit wirksam, im gekochten länger. Über die Natur dieser Stoffe läßt sich auch nach unseren Kulturversuchen nichts Näheres aussagen. Nur um die sonst für die Entwicklung wichtigen Wirkstoffe kann es sich dabei nicht handeln. Denn sie waren in einer Reihe unserer natürlichen Substrate vorhanden, ohne das Wachstum anzuregen.

E. Zusammenfassung der Ergebnisse

1. Die Keimschlauchlänge ist bei *Peronospora brassicae* vom Nährsubstrat abhängig.
2. Auf Kohlrübenegereibsel läßt sich die Entwicklung des Pilzes von Conidie zu Mycel mikroskopisch verfolgen.
3. Auf infizierten Kohlrübenscheiben bildet sich ein reichliches Luftmycel.
4. Geschlechtliche und ungeschlechtliche Fortpflanzungsform treten am Luftmycel auf.
5. Form und Größe von Conidien und Conidienträgern des Pilzes sind sehr variabel.
6. Beschränktes Mycelwachstum kann in Kohlrübenpreßsaft erzielt werden.
7. Mycelausbreitung und Fruktifikation erfolgt auf Kohlrübendekott-Glucose-Agar, Hafermehl-Agar und Reisstärke-Agar, während bei Bierwürze-Phosphat-Agar außer Mycelwachstum Conidienträgerbildung auch im Nährboden eintritt.

Literatur

- ARENS, K.: Physiologische Untersuchungen an *Plasmopara viticola* unter besonderer Berücksichtigung der Infektionsbedingungen. Jb. Bot. **70**, 93 (1929).
- BAUCH, R., u. U. SIMON: Kulturversuche mit Rostpilzen. Ber. dtsh. bot. Ges. **70**, 145 (1957). — BECK v., G.: Über eine neue Krankheit unserer Radieschen. Sitzungsbericht dtsh. naturwiss. Vereins f. Böhmen, Lotos in Prag N. F. **19**, 281 (1899). — BERLESE, A.: Über die Befruchtung und Entwicklung der Oosphäre bei den *Peronosporaceen*. Jb. Bot. **31**, 159 (1898). — BÜSGEN, M.: Über einige Eigenschaften der Keimlinge parasitischer Pilze. Bot. Zeit. **11**, 53 (1893).
- CONSTABEL, F.: Ernährungsphysiologische und manometrische Untersuchungen zur Gewebekultur der Gymnosporangium-Zellen von *Juniperus*-Arten. Biol. Zbl. **76**, 385 (1957). — CHUPP, A. B.: Manual of vegetable garden diseases. The McMillan company 1925. — CUTTER, V. M.: The isolation of Plant Rusts upon artificial Media and some speculations on the Metabolism of obligate plant parasites. Trans. N. Y. Acad. Sci. Ser. II **14**, 103 (1951).
- EDDINS, A. H.: Control Downy Mildew of Cabbage with Sperguson and Fermate. Fla. Agr. Expt. Sta. Press Bul. 589 (1943).
- FELTON, M. W., and J. C. WALKER: Environmental Factors affecting Downy Mildew of Cabbage. J. Agric. Research **72**, 69 (1946). — FISCHER, ED., u. E. GÄUMANN: Biologie der pflanzenbewohnenden parasitischen Pilze. Verlag G. Fischer, Jena 1929, S. 315.

GÄUMANN, E.: Zur Kenntnis der *Peronospora parasitica* (Pers.) Fries. Zbl. Bakt., II. Abt. **45**, 575 (1916). — Über die Formen der *Peronospora parasitica*. Beih. Bot. Zbl. **35**, I. Abt., S. 1 (1918). — Beiträge zu einer Monographie der Gattung *Peronospora*. Beitr. Kryptogamenflora d. Schweiz **5**, Heft 4 (1923). — Über die Spezialisierung des falschen Mehltaus auf dem Kohl und seinen Verwandten. Landw. Jb. d. Schweiz **40**, 463 (1927). — Die Pilze. Basel: Verlag Birkhäuser 1949. — Pflanzliche Infektionslehre II. Aufl. Basel: Verlag Birkhäuser 1951. — GOTTLEB, D.: Physiologic differences in spore germination. The Botanical Review **16**, 229 (1950).

HOTSON, H., and V. M. CUTTER: The isolation and culture of *Gymnosporangium juniperi-virginianae* Schw. upon artificial media. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **37**, 400 (1951).

JANKE, A.: Arbeitsmethoden der Mikrobiologie Bd. 1. Dresden u. Leipzig 1946.

KLEBAHN, H.: Über das Mycel von *Peronospora pulveracea* Fuckel. Z. Pflanzenkrankh. **35**, 15 (1925). — KUPRIJANOWA, W.: Besonderheiten der Biologie von *Peronospora brassicae* Gäum. (russ.). Botanitscheski Journal **42** **5**, 760 (1957).

LILLY, V. G., and H. L. BARNETT: Physiology of the Fungi. New York: Mc. Graw Hill Book Co. 1951.

MAGNUS, P.: *Peronospora effusa* Grev. auf den überwinternden Spinatpflänzchen bei Berlin, nebst Beobachtungen über das Überwintern einiger *Peronospora*-arten. Abh. Bot. Ver. Prov. Brandenburg **29**, 13 (1887). — Das Auftreten der *Peronospora parasitica*, beeinflusst von der Beschaffenheit und dem Entwicklungszustande der Wirtspflanze. Ber. dtsch. bot. Ges. **12**, 39 (1894). — MELHUS, I. E.: Perennial Mycelium in Species of *Peronosporaceae* related to *Phytophthora infestans*. J. Agr. Res. **5**, 59 (1915). — MOREL, G.: Le développement du Mildiou sur des tissus de Vigne cultivés in vitro. E. R. Ac. Sc. Paris S. 50 (1944). — Recherches sur la culture associée de parasites obligatoires et des tissus végétaux. Ann. des Epiphyties **14**, 1 (1948). — MOREL, G. et R. GAUTHERT: Pathologie végétale et culture des tissus. Rev. scientifique **85**, 649 (1947).

NIELSEN, N.: Wuchsstoffe und Antiwuchsstoffe der Mikroorganismen. Jena: G. Fischer Verlag 1945.

PINCKARD, H. A.: The mechanism of spore dispersal in *Peronospora tabacina* and certain other downy mildew fungi. Phytopathology **32**, 505 (1942).

RAMSEY, G. B.: *Peronospora* in storage cabbage. Phytopathology **25**, 7 (1935). —

ROSTOWZEW, S. J.: Beiträge zur Kenntnis der *Peronosporaceen*. Flora **92**, 405 (1903).

ROSTOFFER, W. H.: Plants and Vitamins. Chron. Botanica, S. 93. Waltham 1949. — SCHULTZ, H.: Zur Biologie der *Bremia lactucae*. Phytopath. Z. **10**, 490 (1937). — SCHWEIZER, Gg.: Über die Kultur von *Claviceps purpurea* (Tul.) auf kaltsterilisierten Nährböden. Phytopath. Z. **13**, 317 (1941).

THUNG, T. H.: *Peronospora parasitica* (Pers.) De Bary, attacking Cabbage heads. Phytopathology **16**, 365 (1926).

UPPAL, B. N.: Relation of oxygen to spore germination in some species of *Peronosporales*. Phytopathology **16**, 285 (1926).

WAGER, H.: On the fertilisation of *Peronospora parasitica*. Ann. Bot. **14**, 263 (1900). — WALKER, J. CH.: Plant Pathology 2nd Ed. p. 566. New York: McGraw Hill Book Company 1957. — WEBER, G. F.: Some diseases of cabbage and other crucifers in Florida. Bull. Univ. of Florida. Agr. of Exp. Stat. **256**, 3 (1932).

ZALEWSKI, A.: Über Sporenabschnürung und Sporenabfallen bei den Pilzen. Flora **41**, 249 (1883).

(From the Institute of Microbiology, Uppsala 7)

Silage Studies VIII

Preparation of Microbe-free Silage

By

PER ERIC NILSSON

With 3 Figures in the Text

(Eingegangen am 3. April 1958)

The investigations that in the course of the years have been carried out on the ensilage of fresh plant material, especially of green crops, are very numerous, and there is an immense volume of literature concerning the results from such work. It is striking, however, how limited the studies of a basic nature are. This applies particularly to detailed studies of the microbial flora which is active in the preserving process and which, in biological preservation, is the factor deciding whether the final result will be good or not.

The preserving activity is generally ascribed to certain lactic-acid forming microbes, especially lactic-acid bacteria belonging to the *Lactobacillus plantarum* group. Lactic-acid is undoubtedly of great importance in biological preservation, and probably large amounts of this acid are produced by the group of organisms mentioned. Data throwing direct light upon the activity of a certain organism on the preserving process are, however, not numerous. Entirely new investigations by STIRLING (1953), KROULIK et al. (1955) and NILSSON and NILSSON (1956) show that organisms belonging to the lactic-acid group of bacteria are practically absent in the living plant material. This implies that the original culture of lactic-acid bacteria is weak when the material is put in silo, which is of course an uncertain beginning for a dominating production of lactic-acid and may partly explain the sensitiveness shown by preservation without adding preservatives.

The above-mentioned lactic-acid bacteria enter the silo in a natural mixed flora which is characteristic for the material that is ensiled. A certain direct or indirect function in the preservation may undoubtedly be ascribed to most groups of organisms in this mixed flora. The lactic-acid bacteria make great demands upon the substrate. A number of the microbes in the silage flora prepare through their activity different components in this substrate. Starch, for example, cannot be exploited as a source of carbohydrate for the production of lactic-acid. In their experiments

with the addition of different amylase preparations RYDIN, NILSSON and TOTH (1955) have beautifully demonstrated how the hydrolysis of the starch with the help of enzymes releases fermentable carbohydrates for the production of lactic-acid. There are probably in the flora microbes which under suitable conditions may contribute with similar activities.

Attention may also be drawn to activities which facilitate the development of less desirable microbe fractions. There is much to support the assumption, for example, that certain groups of aerobic proteolytic bacteria favour the activity of butyric-acid forming microorganisms (NILSSON 1956).

The above-mentioned substrate problem in connection with lactic-acid producing activity in the silage flora is of particular importance for Swedish conditions, as the plant material that is ensiled in this country consists chiefly of a mixture of leguminous plants and grasses, and this is from the outset unfavourable as a substrate for the production of lactic-acid, on account, *inter alia*, of its C : N equilibrium.

In a natural mixed flora one must also reckon with activities directly counteracting certain organisms. There occur in the silage floras numerous organisms which develop antibiotic activity against the lactic-acid bacteria (NILSSON 1956 and NILSSON and NILSSON 1956). What are the conditions for development of such antagonists concerning substrate and environmental conditions and do they influence upon the activity of the lactic-acid bacteria?

Finally, the role played by the enzymes of the plant material itself for the availability of the different components of the material for microbial fermentations has not been explained at all satisfactorily. The influence of such factors as stage of development of the plants, suitable time for the harvesting during the day, degree of desintegration of the plant material etc. on the plants' own enzymes after the harvest seem to be questions of interest in biochemistry of silage.

To deal basically with the problems exemplified above a technique is required which will make possible the study of single microbial activities separately. One must, in other words, be able to achieve ensilage of aseptically cultivated plant material. The possibilities of different silage microorganisms to exploit the plant material in original or in modified form must be charted in experiments with pure cultures. The activity of the plant cells themselves must also be studied on plant material quite free from microbes. The results from such experiments can of course not be referred to directly in a discussion of the role played by the different factors in the preserving process. One obtains, however, data concerning potential activities which under certain given conditions may be manifested. The establishment of certain conditions has to be ascertained in experiments with the mixed flora in its entirety.

As has already been described (NILSSON 1956 and NILSSON and NILSSON 1956), in connection with the study of the composition and development of the microbe floras in ensilages of different quality and on some living „silage plants“, successive isolations of the organisms occurring in the analyses have been carried out. In this way it has been possible to make

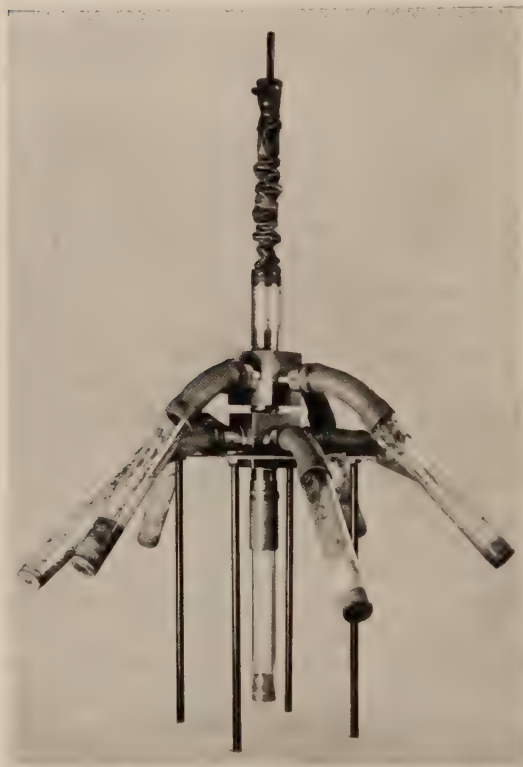


Fig. 1. Apparatus for the cultivation and ensilage of plants under aseptic conditions ready for use

a comprehensive collection of pure cultures, which probably represent a large part of the active silage organisms. The physiology of these pure cultures has been studied in respect of activities of particular interest in connection with ensilage. With these investigations as a point of departure prominent representatives of different microbial groups will be selected and their activity studied in plant material that has been cultivated and ensiled under aseptic conditions. For such experiments an apparatus for aseptic cultivation and ensilage of fodder plants has been constructed and tested in a series of preliminary experiments¹.

The idea of carrying out basic ensilage stu-

dies with the help of aseptic plant material is not new. TRAUTWEIN (1928) ensiled aseptically cultivated corn in order to study lactic-acid fermentation in such material. MABBITT (1951) has given an account of preliminary experiments with the ensilage of aseptically cultivated timothy. Both of these writers pay special attention to the study of the activity of the plant cell themselves after putting the material in silo. The experimental apparatus in the first-mentioned work seems to be completely improvised,

¹ NILSSON, G., and P. E. NILSSON unpublished data.

whereas in the last-mentioned investigation the arrangement upon which the work is based occurs in connection with the breeding of microbe-free animals for experiments. The arrangement of which an account will be given below is very compact and is made up of standardized units which can be assembled to form an apparatus permitting the cultivation and ensilage of widely varying quantities. Further, the two phases of cultivation and ensiling are brought together in one and the same apparatus, which eliminates risks of infection when transferring the plant material from the cultivating chamber to the silo.

Construction and use of the apparatus. The construction of the apparatus may be seen in Figs. 1—3. All metal parts are made of stainless steel. The different units are shown separately in Fig. 3. The construction makes it possible to assemble a larger or smaller number of units each

having 4 cultivation tubes (30×200 mm.), enabling a simple and rapid adaptation according to the need for plant material. This flexibility of the construction is particularly valuable, as the fodder which may come into the question for ensilage studies varies widely in respect of the amount of

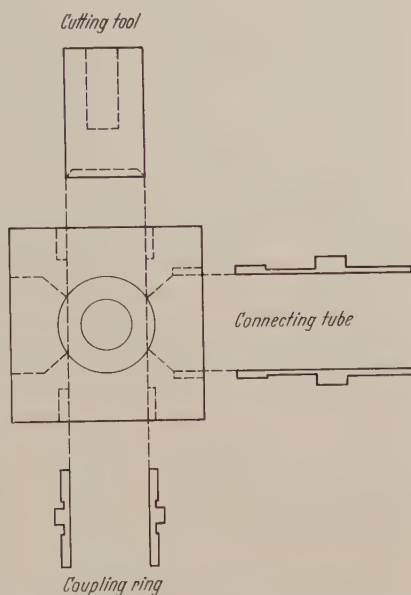


Fig. 2. Skeleton sketch of ensilage apparatus (1 : 1)



Fig. 3. Units in the apparatus for the cultivation and ensilage of plants under aseptic conditions

green mass that can be produced in a definite cultivation volume. To obtain an ensilable amount of plant material it may therefore be required to carry out the cultivation in a larger or smaller number of units.

In the preliminary ensilage experiments performed in the apparatus oats and peas were used. These two plant-species are not among those more generally used for ensilage, but were chosen because they are quick-growing representatives for grasses and leguminous plants. Surface-sterilization and sterility controls were carried out according to the methods described by NILSSON (1957). The cultivation tubes are sterilized separately, provided with cottonwool stoppers and containing a 5 cm layer of white quartz-sand (1–4 mm) and a nutrient solution (according to NUTMAN) to the same level as the quartz-sand. In each cultivation tube are planted four surface-sterilized and germinated seeds. When the plants were so far developed as to fill the tubes the latter were connected with usual aseptic technique to the ensilage apparatus, which had already been sterilized with the connecting tubing to the cultivation tubes inserted in glass tubes with cottonwool collar.

For the actual transference of the plant material to the silo the plants are cut just above the surface of the quartz-sand. This is effected with a cutting tool inserted through the bottom-stopper in the cultivation tube and provided with a prolongation whereby it is possible to manoeuvre it from the outside. After cutting the plants are transported by the same tool into the central channel drilled through the whole apparatus. A knife in this channel is being moved up and down to cut the plant material into the desired lengths and to push it into the silo.

By not connecting the cultivation tubes to the ensilage unit until the plant material is to be ensiled one has the possibility of using one and the same ensilage unit for a large series of cultivation tubes intended for several silos.

The ensilages made were submitted to careful subsequent controls with reference to the occurrence of microbes in the ensiled plant material. These controls showed that the apparatus and the procedure applied give a microbe-free silage with a high degree of reliability. When using one and the same ensilage unit for ensiling a larger number of plant-cultures in series of silos, however, it proved necessary to sterilize the ensilage unit between the filling of each silo.

The silo can be used directly in combination with a percolation equipment as described by NILSSON (1956 and 1957).

Summary

The construction and use of an apparatus for the preparation of microbe-free silage are described.

The background of the investigations for which the apparatus is used is discussed.

Literature

KROULIK, J. T., L. A. BURKEY, C. H. GORDON, H. G. WISEMAN and C. G. MELIN: *J. Dairy Sci.* **38**, 3, 263 (1955). — MABBITT, L. A.: *Proc. Soc. Appl. Bacteriology* **14**, 2, 147 (1951). — NILSSON, G., and P. E. NILSSON: *Arch. Mikrobiol.* **24**, 412 (1956). — NILSSON, P. E.: *Arch. Mikrobiol.* **24**, 396 (1956). — NILSSON, P. E.: *Arch. Mikrobiol.* **26**, 285 (1957). — RYDIN, C., R. NILSSON and L. TOTH: *Arch. Mikrobiol.* **23**, 376 (1956). — STIRLING, A.: *Proc. Soc. Appl. Bact.* **14**, 2, 151 (1951). — TRAUTWEIN, K.: *Zbl. Bakt.* 2. Abt. **74**, 1 (1928).

(Aus dem Institut für Mikrobiologie der Universität Göttingen)

Untersuchungen über die Pseudomycorrhiza von Gramineen *

Von

ROSEL TOLLE

Mit 8 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. Februar 1958)

Abgesehen von der eigentlichen ektotrophen Mycorrhiza bei Waldbäumen oder der typischen endotrophen Mycorrhiza bei Orchideen usw. hat man bei vielen Pflanzen, so auch Kulturpflanzen, eine Infektion der Wurzel gefunden, die man nicht als eigentliche Mycorrhiza ansprechen kann.

Es fehlen die äußerlichen Kennzeichen der Wurzelverdickung und auch die massenhafte Entwicklung des Pilzes in oder außerhalb der Pflanze, wie sie etwa im Pilzmantel der Waldbäume oder in Wurzeln und Rhizomen der Orchideen vorhanden sind. Am ehesten wäre sie vielleicht mit der Mycorrhiza der Ericaceen zu vergleichen, für die der Endophyt nicht existenznotwendig ist und die deshalb nur in einem lockeren Verhältnis zu ihm stehen. Man hat den Eindruck, daß es sich in diesen Fällen um einen gemäßigten Parasitismus handelt. Dafür würde einerseits eine gewisse Schädigung der Pflanze sprechen und andererseits vielleicht auch die Beobachtung, daß sich diese Art der Wurzelverpilzung bei Kulturpflanzen vornehmlich auf vernachlässigten, verunkrauteten Böden findet (WINTER 1951, 1953). Trotz manchen histologischen Beobachtungen, die zum Teil stark an die Erscheinung einer echten Mycorrhiza erinnern, wird es deshalb bis zur endgültigen Aufklärung des Problems besser sein, zunächst von einer Pseudomycorrhiza zu sprechen.

Der Sinn der typischen ektotrophen und endotrophen Mycorrhizabildung ist zwar noch nicht in allen Einzelheiten aufgeklärt, im allgemeinen aber sieht man in der Wurzel-Pilz-Verbindung ein symbiontisches Verhältnis. Der Pilz findet in bzw. an der Wurzel günstige Existenzbedingungen, und die Pflanze wird durch ihn mit notwendigen Nährstoffen beliefert (Isotopenversuche an Bäumen, MELIN u. NILSSON 1952; Kohlenstoffbelieferung an chlorophyllose Orchideen, MAGNUS 1900). Bei der hier zur Diskussion stehenden Pseudomycorrhiza ist noch alles ungewiß.

Bisherige Untersuchungen über die Pseudomycorrhiza an Kulturpflanzen

1. Vorkommen. KAMIENSKI (1882), SCHLICHT (1889), JANSE (1892) und STAHL (1900) waren die ersten, die über die endotrophe Pilz-Wurzel-Verbindung berichteten. Sie fanden sie in fast allen Erdteilen verbreitet und konnten feststellen, daß endophytenführende Pflanzen zahlreicher sind als endophytenfreie. Nur Wasserpflanzen wurden stets unverpilzt gefunden. STAHL (1900) hat nachgewiesen, daß mit Ausnahme von *Crassulaceen*, *Scleranthaceen*, *Papaveraceen*, *Cruciferen*, *Fumariaceen*

* Auszug aus der gleichlautenden Dissertation (R. KNOBLOCH) der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Göttingen 1957.

und *Saxifragaceen* alle Pflanzenfamilien Arten mit endotropher Wurzelverpilzung aufweisen. Von unseren Kulturpflanzen wurde zuerst bei der *Kartoffel* eine endotrophe Mycorrhiza festgestellt (BERNARD 1902, 1911). MAGROU (1914, 1921) beschäftigte sich mit der Mycorrhiza von *Solanum dulcamara*. Später erschienen Arbeiten von PEYRONEL (1922, 1924a) über die Mycorrhiza bei *Weizen*, *Hafer*, *Gerste*, *Roggen* und *Mais*. Durch diese Veröffentlichungen wurde das Interesse wieder auf die Kulturpflanzen gelenkt und es erschienen Publikationen über die Mycorrhizabildung bei *Zuckerrohr* von COSTANTIN (1924, 1933) und CIFERRI (1928), bei *Erbse*, *Bohne*, *Klee*, *Luzerne*, *Zwiebel*, *Spargel*, *Mais*, *Hirse* und *Erdbeere* von JONES (1924). Im Jahre 1934 berichtet ASAI, an fast allen japanischen Landpflanzen Mycorrhiza-ausbildungen beobachtet zu haben. DOMINIK (1946, 1949) fand *Obstbäume* stets mit Endophyten behaftet. BOUILLARD (1947, 1948, 1950) stellte Mycorrhiza auch bei *Cornaceen* fest.

In neuerer Zeit wird das Problem der Mycorrhizaausbildung bei Getreidearten¹ in verschiedenen Ländern erörtert. Besonders beschäftigten sich STRZEMSKA (1950, 1952, 1953, 1955), KUKLINA-KERUSHEVA (1952) und WINTER (1950, 1951, 1953) damit. Von den meisten Autoren wird beschrieben, daß es sich bei dem Endophyten um eine Zugehörigkeit zu den *Phycomycetes* handelt. Charakteristisch hierfür sind die vielkernigen unseptierten Hyphen, die man nur bei Phycomyceten antrifft. Diese Hyphen verzweigen sich in den Wirtszellen in kurze bäumchenartige Ästchen, die nach GALLAUD (1905) als Arbuskeln bezeichnet werden. Da diese Arbuskeln von der Pflanze verdaut werden, unterliegt die Phycomyceten-Mycorrhiza der Thamniskophagie [siehe BURGEFF (1938)]. Es entstehen so die sogenannten Sporangiolen (JANSE 1892), in denen die Überreste der Hyphen abgekapselt liegen. In früheren Jahren hat man die unverdaulichen Hyphenreste von klümpchenähnlicher Gestalt irrtümlicherweise als Fortpflanzungsorgane der Pilze angesehen und somit als Sporangiolen bezeichnet; heute erscheint diese Benennung unangebracht und die Bezeichnung Vesikel erscheint besser.

2. Bedeutung. Über die stoffwechselphysiologische Bedeutung der Pseudomycorrhiza für Pilz und Pflanze ist wenig bekannt. FRANK (1885), SCHLICHT (1889) und HÖVELER (1892) nahmen zunächst an, daß die Pilze die direkte Ernährung der Pflanze aus dem Humus vermitteln, indem sie unlösliche Humusbestandteile in eine lösliche und damit für die Pflanze zugängliche Form bringen. JANSE (1892) glaubt an eine Bindung des freien Stickstoffs durch die Pilze, wie es auch die Rhizobien bei Leguminosen tun. Dieser Stickstoff soll dann nach Umwandlung in eine organische Stickstoffverbindung gegen Kohlenhydrate der Pflanze eingetauscht werden. STAHL (1900) ist der Ansicht, daß die Pilze über den Wassertransport die Nährsalzaufnahme für die Pflanze erleichtern. Dieser Auffassung haben sich viele Autoren angeschlossen; sie ist jedoch bis heute nicht eindeutig bewiesen aber auch nicht widerlegt worden. HATCH (1937) nimmt an, daß der Endophyt die Absorptionsoberfläche der Wurzel vergrößert. MITCHELL, FINN u. ROSENDAHL (1937) glauben, daß die Pilze den Wurzeln organischen Stickstoff, mineralische Nährsalze, Auxine und Enzyme zugänglich machen. FREISLEBEN (1934, 1935) vermutet, daß Mycorrhizapilze im Boden befindliche Hemmstoffe inaktivieren und somit der Pflanze eine bessere Entwicklung ermöglichen. PEYRONEL (1924b, 1932, 1940) und HOWARD (1948) glauben an eine Beziehung zwischen Humusgehalt und Mycorrhizaausbildung. SCHLICHT (1889) führt Beweise dafür an, daß das Vorhandensein der Mycorrhiza mehr vom Humusgehalt des Bodens als von der lebenden Pflanzen-

¹ Anmerkung bei der Korrektur. L. V. KRUGER, Microbiologija, russ. mit englischer Zusammenfassung 26, 60 (1957) beschreibt die Mycorrhiza von Wiesengräsern und sonstigen Wiesenpflanzen.

wurzel abhängig ist: Bei Umsetzung in humusfreien Boden verlieren die Pflanzen ihre Wurzelpilze. HOWARD (1948) behauptet, daß Mycorrhizen vor pathogenen Keimen schützen. Manche Autoren (WINTER 1951, 1953, SIEVERS 1953) halten den Endophyten für einen harmlosen Parasiten und lehnen dessen Bedeutung für die Nährstoffdynamik ab, da die Zahl der austretenden Hyphen sehr gering ist. Dagegen meint RAYNER (1927), daß die große Verbreitung der Mycorrhizapilze in fast allen Pflanzen und allen Gegenden gegen einen Parasitismus spricht. Das gleiche Argument führte SCHLICHT schon im Jahre 1889 an und meint darüber hinaus, daß das gute Gedeihen der mit einer endotrophen Mycorrhiza behafteten Pflanze keinen perniziösen Parasitismus annehmen läßt. Bei *Tabak* hat soeben PEUSS (1958) die Nützlichkeit der Mycorrhiza nachgewiesen.

Eine definitive Beurteilung des gesamten Pseudomycorrhizaproblems wird erst dann möglich sein, wenn die Isolierung der Pilze aus der Pflanzenwurzel, ihre Reinkultur und Synthese mit einer sterilen Pflanzenwurzel zu einer neuen Mycorrhiza gelingt.

Die Isolierung des Mycorrhizapilzes

1. Bisherige Isolierungsversuche des Mycorrhizapilzes aus den Wurzeln verschiedener Pflanzenarten

Versuche zur Isolierung des Mycorrhizapilzes mit dem Ziele seiner Identifizierung und experimentellen Synthese mit Pflanzenwurzeln wurden bereits von verschiedenen Forschern in Angriff genommen. BERNARD (1911) zog aus der Wurzel von *Solanum dulcamara* eine *Mucor*-Art, die er für den Mycorrhizapilz hielt. Er konnte diese Pilze *in vitro* zum Keimen bringen, das Wachstum der Hyphe hörte jedoch schon nach kurzer Zeit auf und konnte nicht mehr zur Weiterentwicklung gebracht werden. MAGROU (1921) isolierte aus der gleichen Pflanze die gleiche *Mucor*-Art und nannte sie *Mucor solani*. Auch er hielt diesen Pilz für den Mycorrhizapartner, da er in Reinkultur auf Gelatinesubstanz Arbuskeln und Vesikeln ausbildete, ähnlich wie es tatsächlich die Mycorrhizapilze tun. Bei Beimpfung steriler Pflanzen mit diesem Pilz soll dieser in die Wurzel eingedrungen und wiederum Vesikel- und Arbuskelbildung gezeigt haben. LIHNELL (1939) hält die Abbildungen dieser synthetischen Mycorrhiza für wenig überzeugend. MAGROU selbst empfiehlt auch weitere Versuche zur Feststellung der Identität dieses Pilzes mit dem Mycorrhizapilz. DEMETER (1923) isolierte aus der Wurzel von *Vinca minor* und *Vincetoxicum officinale* eine *Rhizoctonia*-Art. Auch hier fehlt der Beweis dafür, daß der Pilz mit dem Mycorrhizapilz identisch ist. JONES (1924) hat Mycorrhizapilze von *Allium*-Arten zu beginnender Entwicklung gebracht. Das Wachstum der Hyphe stellte sich jedoch bald ein, so daß eine Identifizierung des Pilzes nicht vorgenommen werden konnte. Zusammen mit GALLAUD (1905) ist er der Ansicht, daß die Mycorrhizapilze eng an die Wurzel gebunden sind und deshalb nur in Verbindung mit der Pflanze zur Entwicklung kommen. MCLUCKIE u. BURGESS (1932) erhielten bei ihren Isolierungsversuchen aus *Eriostemon crowei* einen Pilz, der wiederum zur *Rhizoctonia* gehört. Den wirklichen Symbionten konnten auch diese Autoren nicht isolieren. FREISLEBEN (1934) führte ergebnislose Isolierungsversuche an *Vaccinium (vitis-idaea, myrtillus)* durch. Die Isolierungsversuche von BOUWENS (1937) waren erfolglos. Er isolierte zwar Pilze vom *Rhizoctonia*-Typ aus *cydonia vulgaris* und *Fragaria vesca*, fand aber, daß es sich bei der folgenden Synthese nicht um den tatsächlichen Mycorrhizapilz handelte. MAGROU (1935, 1936, 1937) stellte Versuche mit *Arum maculatum* an. Er vereinte ein Wurzelstück mit herauswachsenden Hyphen mit einer aseptischen Keimpflanze von *Arum italicum* miteinander und konnte so

eine Weiterentwicklung des Pilzes in den Wurzeln dieser Pflanze erzielen. Nach 3 Wochen ließ sich eine typische Mycorrhizainfektion nachweisen. Außerhalb der Pflanze konnte jedoch kein Wachstum des Pilzes beobachtet werden, so daß seine Reinkultur und damit seine Identifizierung unmöglich wurde. MOSTAFA (1938) isolierte aus den Wurzeln von *Tropaeolum majus* und *Phlox drummondii* weiße Mycelien, die dem *Rhizoctonia*-Typ angehörten. Er gibt an, daß ihm die Synthese des genannten Pilzes mit *Tropaeolum* gelungen sei. Andere Autoren bezweifeln das. BURGEFF (1938) berichtet, daß aus Rhizomstücken von *Psilotum* stets querwandlose Hyphen auswuchsen, die sich aber nur sehr langsam entwickelten und ihr Wachstum bald ganz einstellten. LIHNELL (1939) führte vergebliche Isolierungsversuche an *Vinca minor*, *Pisum sativum* und *Paris quadrifolia* durch. Er konnte das Wachstum einer dicken unseptierten Hyphe beobachten, das sich jedoch bei einer Länge von 2—3 mm einstellte. M. STAHL (1949) machte bei Lebermoosen, deren Prothallien auf 1% igem Regenwasser-Agar ausgelegt wurden, ähnliche Beobachtungen. Im Jahre 1952 versuchte SIEVERS vergeblich aus *Allium porrum* den Mycorrhizapilz zu isolieren. Nach den Angaben von BUTLER (zit. nach MOSSE 1956) scheint es sich bei der Pseudomycorrhiza um *Phycomyces* zu handeln.

2. Eigene Isolierungsversuche des Mycorrhizapilzes aus Gramineenwurzeln

Trotz den oben angeführten zahlreichen negativen Isolierungsversuchen des Endophyten aus verschiedenen Pflanzen glaubte ich durch die Anwendung eines geeigneten Nährsubstrates das Problem der Isolierung des Mycorrhizapilzes von neuem angreifen zu können. Aus der Literaturübersicht geht hervor, daß die Züchtung des Mycorrhizapilzes auf künstlichen Nährsubstraten in keinem Fall zum bewiesenen Erfolg geführt hat. Dagegen zeigten bei eigenen Versuchen Mycorrhizapilzhypen in Pflanzenschnitten eine gewisse Wachstumstendenz, wenn sie mit aseptischen Pflanzen in Verbindung gebracht wurden. Es lag daher nahe, für die Pilzzüchtung möglichst natürliche Nährmedien zu schaffen, wie z. B. Wurzelpreßsaft, Wurzelausscheidungen o. ä. In den folgenden Versuchen war es daher meine Absicht, dem Pilz solche Nährsubstanzen anzubieten, die er auch in seinem natürlichen Milieu, der Pflanzenzelle, vorfindet.

a) Material

Als Versuchsobjekt für die Isolierung des Mycorrhizapilzes dienten mir Wurzeln von *Gerste*, *Hafer*, *Roggen* und *Weizen*. Durch einfache mikroskopische Untersuchung von mit Methylenblau-Glycerin (1:3) gefärbten Schnittpräparaten wurden zunächst diejenigen Standorte im Göttinger Raum ermittelt, an denen die stärkste Mycorrhizausbildung zu finden war. Es handelte sich in der Regel um Getreidefelder mit gut feuchtem Boden. Um festzustellen, ob die Isolierung des Pilzes vielleicht nur zu einem bestimmten Zeitpunkt der Vegetation möglich ist, wurden die Untersuchungen von Ende April bis Ende September durchgeführt.

b) Methodik

aa. Oberflächensterilisierung der Pflanzenwurzeln

Vor einer Isolierung der endotrophen Mycorrhizapilze ist es zunächst notwendig, die Bakterien und Pilze von der Oberfläche der Wurzel zu entfernen. Dieses versuchte ich zunächst nach der Methode von WILSON (1915) zu erreichen.

Technik: 10 g Chlorkalk werden in 140 cm³ Aqua dest. gelöst. Diese Lösung läßt man 7—10 min auf die Wurzeloberfläche einwirken. Anschließend werden die Wurzeln mehrfach (mindestens dreimal) in sterilem Wasser ausgewaschen. Diese Wilsonsche Methode bewirkte zwar eine vollkommene Oberflächensterilisierung, die Gramineenwurzeln und die endotrophen Mycorrhizapilze blieben jedoch nicht unbeeinträchtigt. Während in unbehandelten Schnitten die Hyphen des Endophyten Wachstumserscheinungen und nach längerer Beobachtungsdauer auch Fetttropfenbildung zeigten, konnten derartige Symptome in den nach oben angegebener Methode behandelten Schnitten nicht beobachtet werden. Ich wandte mich deshalb der schonenderen Methode von HARRISON (1955) zu.

Die Wurzeln werden rein mechanisch in Seifenwasser von anhaftenden Bodenteilchen durch Abwaschen und Schütteln befreit, einige Male kräftig in stark fließendem Leitungswasser abgespült und in einen Kolben mit sterilem Aqua dest. übertragen. Hier werden sie wiederum einige Minuten lang kräftig geschüttelt. Das sterile Wasser muß dabei mindestens dreimal erneuert werden. Diese Methode von HARRISON wurde von mir in folgender Weise modifiziert: Statt Seifenwasser verwendete ich die sehr oberflächenaktiven Waschmittel Rei und Pril. Das sterile Spülwasser wurde 5mal erneuert und dem vorletzten Spülwasser wurden 5 γ Aureomycin je Kubikzentimeter Wasser zugesetzt. Diese Methode hat sich in meinen Versuchen gut bewährt und zeigte keinerlei schädliche Einwirkung auf die Wurzel oder ihren endotrophen Pilz. Der Endophyt zeigte im geeigneten Substrat Wachstumserscheinungen mit später eintretender Fetttropfenbildung. Vereinzelt auftretende Infektionen waren nicht auf diese Sterilisierungsmethode zurückzuführen, sondern ließen sich bei der Technik der Schnittdurchführung in manchen Fällen kaum vermeiden.

bb. Technik der Schnittanfertigung und Deckglaskultur

Unter möglichst sterilen Bedingungen wurden die Wurzeln in durch Alkohol fixiertes Holundermark eingebettet und geschnitten (Handschnitte von etwa 10 bis 15 μ Dicke). Die Schnitte wurden zusammen mit einem Tropfen steriler Nährlösung auf sterile Deckgläschen gebracht und diese wiederum auf sterile Hohl-schliffobjektträger aufgesetzt. Diese Deckglaskulturen wurden in einer feuchten Kammer gehalten, um sie gegen Austrocknung zu schützen.

cc. Nährsubstrate für die Pilzzüchtung

Da die meisten Pilze gut auf Malzextrakt gedeihen, sogar auch schwer zu züchtende, wie z. B. *Hymenomyces*, ging ich zunächst von ihm aus:

1. Biomalz 1% + 10 bzw. 20 γ Aureomycin. — 2. Biomalz 1% + Zusätze (Cysteinhydrochlorid bzw. 0,1% Na-Ascorbinat, zur Herabsetzung des Redox-potentials). — 3. Biomalz 1% + 1% Albumen ovi als N-Quelle nach M. STAHL. — 4. Biomalz 1% + CaCl₂ nach M. STAHL. — 5. Biomalz 1% + 1 bzw. 10% inaktives Serum (Kaninchen). — 6. Biomalz 1% + 1 bzw. 10% aktives Serum.

Natursubstrate: 7. Wurzelbrei von alten Porreewurzeln + Ascorbinsäure. — 8. Wurzelbrei + Cysteinhydrochlorid. — 9. Humusextrakt (wäßriger Erdauszug) mit pH 6,7; a) ohne Zusatz mit hineinragenden Getreide- und Porreewurzeln nach M. STAHL, b) mit Ascorbinsäure, c) mit Cysteinhydrochlorid. — 10. Wurzelau-scheidungsstoffe in Erdauszug bzw. Leitungswasser. — 11. Wurzelsaft von jungen Gerstenkeimlingen, hergestellt durch Auspressen junger Wurzeln; a) mit Ködern (Pollen), b) mit Ascorbinsäure, c) mit Wurzelau-scheidungen in Erdauszug. — 12. Regenwasser + 1% Malz als C-Quelle. — 13. Regenwasser + 0,5% Glucose nach M. STAHL. — 14. Regenwasser + 0,5% Amygdalin. — 15. Regenwasser + 0,5% Mannit. Die Substrate wurden bei einem pH von 6,8—7,2 steril durch ein

Membranfilter filtriert, da bei der Verwendung von Seitz EK-Filtern Wachsstoffe leicht adsorbiert und somit dem Pilz entzogen werden können.

Feste Substrate: 16. Malzagar 1% + 0,5 bzw. 1,0 bzw. 1,5% K-Rhodanid. Es wurden Petrischalen gegossen und Wurzelstücke aufgelegt. Die K-Rhodanid-Zugabe diente zur Unterdrückung der Bakterien. — 17. Regenwasseragar 1,5% + 1% Albumen ovi nach M. STAHL. Ich verwendete Blattagar, der durch Seitz EK-Filter steril filtriert wurde.

Die oben aufgeführten Nährsubstrate wurden durch Membranfilter (Durchlässigkeitsstufe mittel, Gruppenbezeichnung 4) kalt sterilisiert, da nach allgemeiner Ansicht die Hitzesterilisierung viele organische Stoffe verändern und das Pilzwachstum mehr oder weniger ungünstig beeinflussen kann. Zum Beispiel zeigen die ektotrophen Mycorrhizapilze der Hymenomyceten auf sterilisiertem Humus kein Wachstum.

dd. Kultivierung steriler Pflanzen

Samensterilisierung. Für die Herstellung von Wurzelausscheidungen als Kulturfiltrat ist zunächst die Züchtung steriler Pflanzen Voraussetzung, um mikrobielle Verunreinigungen auszuschalten. Es mußte also eine Methode gefunden werden, um Samen äußerlich zu sterilisieren, ohne sie in ihrer Keimfähigkeit zu beeinträchtigen. Aus der Literatur sind zahlreiche derartige Methoden zur Oberflächensterilisierung von Samen und Fruchten bekannt. KLEIN u. KISSER (1924) sowie WEISSFLOG (1933) geben einen guten Überblick über die bisher verwendeten Methoden. In neuerer Zeit berichten STOLP (1952), METZ (1955) und NILSSON (1957) darüber. Die Methoden der Oberflächensterilisierung müssen den jeweiligen Verhältnissen (Pflanzenart, Beschaffenheit ihrer Samen usw.) angepaßt werden. Durch Verwendung quaternärer Ammoniumbasen (Typ 884 150) erhielt ich bei allen Samen gute Oberflächensterilität, aber die Keimfähigkeit war stark reduziert. Sie betrug bei Getreide nur noch 10%. Ähnliche Beobachtungen machte METZ (1955) mit *Lepidium*-Samen, während STOLP (1952) bei *Erbsen* keine Schädigung der Keimkraft feststellen konnte. Nach diesen unbefriedigenden Ergebnissen mit quaternären Ammoniumbasen wandte ich mich dem neuerdings propagierten Äthylenoxyd zu: In einer Konzentration von 1% erreichte ich keine befriedigende Sterilität. Konzentrationen über 1% bewirkten den vollständigen Verlust der Keimfähigkeit. Außerdem erscheint das hochexplosive Äthylenoxyd, das nur unterkühlt verwendet werden kann, wegen seiner Gefährlichkeit wenig geeignet. Aus diesem Grunde verwendete ich zu den folgenden Sterilisierungsversuchen 0,75% iges Bromwasser in einer eigens für diesen Zweck konstruierten Apparatur.

Einen guten Sterilisationseffekt konnte ich auch ohne apparativen Aufwand mit folgenden Modifikation der Methode von MELN erreichen: Die Samenkörner werden zunächst in Reiwasser unter kräftigem Schütteln gewaschen und anschließend für bestimmte Zeit einer Sublimatlösung (1:1000) ausgesetzt. Die empirisch ermittelte optimale Einwirkungszeit beträgt für Roggen und Weizen 5 min, für Hafer und Gerste 7 min. Durch 5maliges Waschen in sterilem Aqua dest. werden Reste der Sublimatlösung entfernt. Zur Kontrolle des Sterilisationseffektes müssen die Körner daraufhin auf Agarplatten (1,2% Agar in Aqua dest.) zum Keimen ausgelegt werden.

Weiterzüchtung sterilen Samens. Zur Weiterzüchtung des nach der oben angegebenen Methode sterilisierten Samens benutzte ich Reagensgläser, die bis zu einer Höhe von 7 cm mit etwa 5 mm großen Glasperlen gefüllt waren. Ein Teil der Reagensgläser wurde dann mit je 6,5 cm³ sterilem Leitungswasser, ein anderer Teil mit 6,5 cm³ steril filtriertem Erdauszug beschickt. Es blieb dann ein Zwischenraum von etwa 1 cm zwischen der oberen Grenze der Glasperlen und dem Flüssigkeits-

spiegel frei. Damit wurde vermieden, daß eventuelle Samenauscheidungen in die Flüssigkeit übertreten konnten. Nach 48—74 Std begann der Samen zu keimen und bildete nach etwa 7 Tagen ein Wurzelsystem von 9—11 cm Länge aus. Die Wurzel-
ausscheidung konnte in dieser Zeit in das umgebende Substrat übertreten. Nach 8 Tagen wurden diese Flüssigkeiten als Nährmedien für die Isolierung des Mycorrhizapilzes verwendet.



Abb. 1. Eintrittspforte der Mycorrhizapilzhyphe durch ein Wurzelhaar vom Hafer.
(Hyphendicke etwa 9—14 μ)

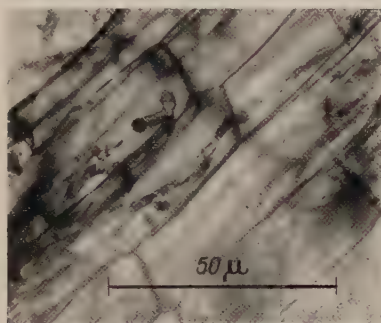


Abb. 2. Längsschnitt einer mit Mycorrhizapilzen infizierten Haferwurzel

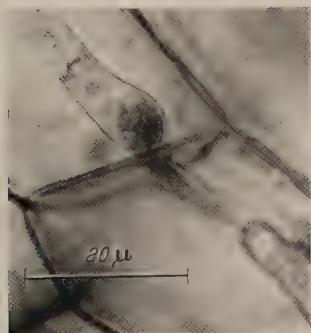


Abb. 3. Durchtritt einer Mycorrhizapilzhyphe durch die Wand einer Wurzelzelle vom Hafer



Abb. 4. Windungen von Mycorrhizapilzhypen in einer isolierten Wurzelzelle vom Hafer

3. Ergebnisse der Isolierungsversuche

Bei meinen Objekten (Hafer, Weizen, Roggen und Gerste) zeigt der Pilz folgendes Bild:

1. Hafer: Im Vergleich zu Weizen, Roggen und Gerste treten bei den Mycorrhizapilzen von Hafer Hyphen mit und ohne Septierung auf. Auf Grund des mikroskopischen Bildes scheint die Hauptinfektion des Hafers mit Mycorrhizapilzen — ebenfalls im Gegensatz zu den anderen genannten Gramineenarten — durch die Wurzelhaare stattzufinden (Abb. 1—4).

2. Weizen: Hyphen durchweg unseptiert. Die Pilzhypen treten hauptsächlich durch die Epidermis der Wurzel ein, denn in der subepidermalen Schicht sind zahlreiche geschlängelte Hyphen nachzuweisen. Nur vereinzelt findet man Infektionsschläuche in den Wurzelhaaren.

3. Roggen: Das mikroskopische Bild der Pilzhypen in Roggenwurzeln ähnelt vollkommen dem des Weizens. Ich konnte keine wesentlichen morphologischen Unterschiede feststellen.

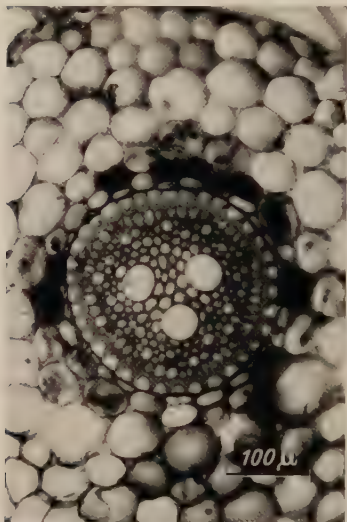


Abb. 5. Die Lokalisation von Mycorrhizapilzhypen um den Zentralzylinder einer Gerstenwurzel. Färbung mit Methylenblau

4. Gerste: Hyphen durchweg unseptiert. Eintrittspforte der Hyphen wiederum durch die Epidermisschicht. Im Vergleich zu den anderen Gramineenarten sind die Hyphen zarter und schmaler.

Charakteristisch für sämtliche Mycorrhizapilze an Gramineen ist ihre Hauptlokalisation in den innersten Schichten der Wurzelrinde, direkt um die Endodermis (Abb. 5).

Bei Biomalz mit den verschiedensten Zusätzen und auch bei Regenwasser mit Zusätzen verschiedener C-Quellen wuchsen nach wenigen Tagen *Mucor*-Arten und conidienbildende *Fungi imperfecti*, insbesondere *Fusarium* spp., aus. Vom Wachstum der Hyphen in den

Parenchymzellen war nichts zu sehen. Auch bei Schnitten, die ohne Infektion geblieben waren, war selbst nach 2 Monaten noch kein Wachstum der Hyphen des Mycorrhizapilzes eingetreten. Nur bei Biomalz + CaCl_2 und Biomalz + Cysteinhydrochlorid konnte ich nach 4 Wochen ein schwaches Wachstum der Hyphen beobachten. Jedoch kamen die Hyphen niemals über die Epidermis des Schnittes hinaus. Bei Regenwasser + Amygdalin machte ich später die gleiche Beobachtung. Bei einigen Schnitten mit Bodenextrakt und den Zugaben von Cystein und Ascorbinsäure konnte ein Zuwachs der Hyphen festgestellt werden, der aber bald stagnierte. Bodenextrakt ohne Zugabe war wirkungslos. Im Erdauszug mit verschiedenen pH-Werten (5,7—6,6) ließ ich nach M. STAHL gut verpilzte Wurzeln an Zwirnsfäden einhängen. Die Wurzeln waren nach HARRISON oberflächlich sterilisiert und so in die Flüssigkeit gehängt, daß die Schnittseiten den Wasserspiegel eben berührten. Die möglicherweise aus der Wurzel austretenden Hyphen konnten so in die Flüssigkeit hineinwachsen. M. STAHL bekam mit dieser Methode sehr gute Ergebnisse. Bei meinen Versuchen bildeten sich nach 2 Wochen bei einigen Wurzeln an

der Berührungsstelle mit dem Wasser zarte Hyphenbüschel aus, die jedoch keine Ähnlichkeit mit dem Endophyten aufwiesen. Die Hyphen waren dünn und septiert und kamen auch an den auf Agarplatten ausgelegten Wurzeln vor.

Mit festen Substraten arbeitete ich nur wenig. Ich legte gut verpilzte Wurzelstücke auf Agar aus, um Auswachsen der Hyphen zu erhalten. Später brachte ich neben eine stark verpilzte Wurzel Wurzelstücke einer aseptischen Pflanze. Hierbei stellte sich einige Male die Infektion mit einem Pilz ein, der wie eine Schneeflocke am Ende der verpilzten Wurzel saß. Er ließ sich auf Malz- und Würzeagar weiter kultivieren. Auch hier bildeten seine Hyphen ein zartes weißes Netz. Häufig wurde auch ein längeres Wurzelstück vom gleichen Pilz umhüllt. Die Hyphen waren etwa 3μ dick und zeigten manchmal schwer sichtbare Querwände. SIEVERS (1953) beobachtete in einem Fall auf Regenwasseragar die gleiche Erscheinung. Er führt an, daß CAPPELLETTI (1931a) einen ähnlichen Pilz aus *Allium roseum* isoliert hat, den er für eine *Rhizoctonia*-Art hielt. Auch SIEVERS konnte den Pilz nicht bestimmen, da er keine Fruchtkörper bildete. Der Pilz gedieh bei ihm auf einigen Substraten besser in Gegenwart einer jungen Pflanze. Eine Wurzeluntersuchung, die ich nach 14 Tagen vornahm, zeigte keine Mycorrhizabildung, doch eine die Zelle schädigende Infektion, wobei die ganze Wurzel von Hyphen durchwuchert wurde. Bei Quer- und Längsschnitten konnte ich keine Ähnlichkeit mit den Hyphen eines wirklichen Mycorrhizapilzes feststellen, vielmehr eine stärkere Schädigung der Zellen. Auch MELIN (1925) und LIHNELL (1939), hatten gefunden, daß das Wachstum gewisser Pilze (Basidiomyceten) auf Agar gehemmt ist. Die gleichen Beobachtungen machten auch GERDEMANN (1955) und MOSSE (1956).

Das Mißlingen meiner Isolierungsversuche war auf ungeeignete Substratbedingungen zurückzuführen. Aus diesem Grunde bin ich zu dem für die Pilze natürlichen Substrat der Wurzelausscheidungen übergegangen (Methode S. 290/91). Es handelt sich bei den Wurzelausscheidungen um solche Stoffe, die auch in lebenden Pflanzenzellen anzutreffen sind: Zum Beispiel organische Säuren, Pyridin-Derivate, Aminosäuren, Nucleotide, Alkaloide, verschiedene Zucker, verschiedene Enzyme und andere mehr¹. In je einem Tropfen der Wurzelausscheidungen enthaltenen Flüssigkeit brachte ich Schnitte gut verpilzter Wurzeln von Gramineen und Porree. Schon nach 3 Tagen stellte sich Wachstum der Hyphen ein. Besonders schien der Wurzelsausscheidungen enthaltende Erdauszug als Substrat gut geeignet. Das Hyphenwachstum wurde mikroskopisch eingehend verfolgt (Abb. 6 u. 7).

¹ Daß unter der Einwirkung von Mikroorganismen organische Stoffe aus der Wurzel ausgeschieden werden, hat soeben MARTIN (1958) am Beispiel des Scopoletins bei Haferwurzeln gezeigt.

Die erste Wachstumsphase der Hyphen dauerte etwa 6 Tage. Sobald das Wachstum zum Stillstand kam, ließen sich im Plasma der Hyphen kleine Fetttropfen beobachten. Wurden diese Schnitte in ein frisches Substrat übertragen, so setzte eine neue Wachstumsphase ein. Die Hyphe wuchs jetzt wiederum etwa 6 Tage. Bei erneutem Umsetzen in ein frisches Substrat konnte kein Weiterwachstum mehr beobachtet werden. Die in Wurzelausscheidungen wachsenden Hyphen waren querwandlos, das Hyphenplasma fein granuliert.



Abb. 6. Bei Hyphenwachstum des Endophyten aus Haferwurzeln in Wurzelausscheidungen als Nährsubstrat

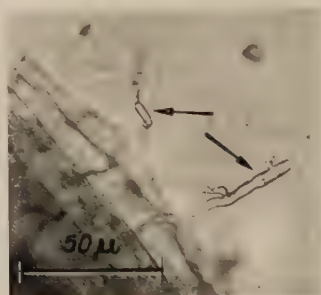


Abb. 7. Bei Hyphenwachstum des Endophyten aus Gerstewurzeln in Wurzelausscheidungen als Nährsubstrat

Bei Unterbrechung des Wachstums sammelten sich im Plasma der Hyphen verschieden große kugelige Fetttropfen an, die durch ihre starke Lichtbrechung deutlich hervortraten. Die Hyphenwände waren an manchen Stellen unregelmäßig ausgebuchtet und erinnerten dadurch an die Hyphen von Endophyten. Nach zweimaligem Umsetzen in frisches Nährsubstrat erreichten die Hyphen in 12 Tagen ein Gesamtwachstum von 1—2 mm. Das langsame Wachstum deutet daraufhin, daß es sich um einen spezifischen Pilz handeln mußte und nicht um eine gewöhnliche Infektion. Auch die gesamte Morphologie der gewachsenen Hyphen spricht dafür, daß es sich um den in den Wurzelschnitten sichtbaren Mycorrhizapilz handelte.

Da die erste Pilzinfektion im Frühjahr, also an ganz jungen Pflanzenwurzeln, nachzuweisen ist, schien mir die Anwendung von Wurzelsaft junger Pflanzenwurzeln als Nährsubstrat für mycorrhizahaltige Wurzelschnitte besonders geeignet. Im Wurzelsaft zeigte sich bei etwa 20% der Schnitte ein Hyphenwachstum, das jedoch auch bei diesem Substrat bald zum Stillstand kam. Sechs Wochen hindurch wurden die Objekte bei ständigem Erneuern des Substrates beobachtet. Im Gegensatz zu den Wurzelausscheidungen bildete das Erneuern des Wurzelsaftes keinen erneuten Wachstumsreiz. Bei Wurzelsaft mit zugesetzten Ködern (Pollen

von *Pinus montana*, verschiedenen *Kompositen*, *Liliaceen* und *Malvaceen*) kam es zu ähnlichen Ergebnissen. Die Hoffnung, daß die zugesetzten Köder durch Ausscheidungsstoffe das stagnierende Wachstum der Hyphe von neuem zur Entwicklung bringen, hat sich nicht erfüllt. Auch Ascorbinsäurezusatz zeigte keine Wirkung. Wurzelsaft in Kombination mit Wurzelausscheidungen in Erdauszug hatte den gleichen Wachstumserfolg wie bei der Anwendung von Wurzelausscheidungen allein.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß die Hyphen der Mycorrhizapilze in Wurzelausscheidungsstoffen am besten wachsen. Die Tatsache, daß sie ihr Wachstum in diesem Substrat nach gewisser Zeit einstellen, spricht aber dafür, daß die Wurzelausscheidungen noch nicht alle Bedingungen für eine Weiterentwicklung der Hyphen erfüllen. Diese Bedingungen aufzufinden, dürfte sehr schwierig sein.

Nach Abschluß meiner Isolierungsversuche wurden mir Arbeiten von MOSSE (1956) und GERDEMANN (1955) zugänglich, in denen das Problem der Isolierung von Mycorrhizapilzen aus dem Boden behandelt wird. GERDEMANN isolierte Sporen aus der Nähe von Kleeurzeln aus dem Boden. Durch Zusammenbringen dieser Sporen mit Kleepflanzen entstand eine *Phycomyceten*-Mycorrhiza. MOSSE fand in der Nähe von Erdbeerausläufern schwarze Fruchtkörper (Sporocarpien), die mit ihren Hyphen an der Erdbeerwurzel hafteten. Nach Beimpfen des Bodens mit Sporocarpien oder Sporen konnte sie in jedem Falle experimentell eine typische Mycorrhiza mit Vesikeln und Arbuskeln an Erdbeerurzeln beobachten. Sie hat erstmalig bei steril aufgezogenen Pflanzen mit Sicherheit experimentell eine endotrophe Mycorrhiza erzeugt. Die Reinkultur des Pilzes ist jedoch auch ihr nicht gelungen.

Die Artspezifität der Mycorrhizapilze

Die Frage, ob jede Pflanze eine spezifische Mycorrhiza besitzt, läßt sich mit Sicherheit erst dann beantworten, wenn man mit in Reinkultur gezüchteten Pilzen eine experimentelle Synthese mit verschiedenen Pflanzen durchführen kann. Gewisse Anhaltspunkte dafür erhält man aber schon durch meine auf S. 291/92 angegebenen mikroskopischen Befunde von verschiedenen Gramineenurzeln, aus denen deutliche Unterschiede in Lage und Form der Hyphen und ihrer Eintrittspforten zu ersehen sind. Um diese mikroskopischen Befunde zu sichern, habe ich unter Umgehung der Reinkultur Infektionsversuche mit mycorrhizahaltigen Pflanzenschnitten an sterilen Wurzeln von *Hafer*, *Weizen*, *Roggen*, und *Gerste* in der Weise angestellt, daß jeder mycorrhizahaltige Wurzelschnitt mit jeder oben angegebenen Pflanze einmal in Berührung kam.

1. Methodik

10 cm weite Töpfe wurden mit gewaschenem Quarzsand gefüllt und bei 150° C trocken sterilisiert. In diesen Quarz wurden oberflächensterilisierte Getreidekeime von Hafer, Weizen, Roggen und Gerste übertragen. Von jeder Getreideart sind 4 Töpfe angesetzt worden, insgesamt 16 Töpfe. Außerdem dienten 4 Töpfe als Kontrolle. Die sich entwickelnden Getreidepflanzen wurden mit steriler Knopscher Nährlösung gegossen. Eine Luftinfektion der feuchten Topfoberfläche ließ sich durch

Abdecken mit einer etwa 1 cm hohen trockenen Quarzschicht unmittelbar nach dem Gießen vermeiden. Jedem weiteren Gießen ging ein Abheben der alten Quarzschicht voraus. Nach etwa 10 Tagen hatte sich ein gutes Wurzelsystem entwickelt. Nunmehr wurden die Versuchstöpfe in der Weise mit endophytenhaltigen Wurzelschnitten von Hafer, Weizen, Roggen und Gerste beimpft, daß jede Pflanzenart mit jedem Wurzelschnitt der eigenen und fremden Art einmal in Berührung kam. Ein steriler Spatel wurde entlang der Wurzel in die Tiefe geführt und diente dem Zurückhalten des Quarzsandes, um das Anbringen des den Endophyten enthaltenden Wurzelschnittes an die Wurzel zu ermöglichen. Mit Hilfe einer sterilen Platinöse wurden nunmehr die mycorrhizahaltigen Schnitte an verschiedene Bereiche der Wurzel gebracht. Die Kontrollen blieben unbeimpft. Acht Tage p.i. wurde durch mikroskopische Untersuchung von Schnitten aus den Wurzeln der infizierten Pflanzen kontrolliert, ob eine Mycorrhizabildung an ihnen zustandegekommen war oder nicht.

2. Versuchsergebnisse

Tab. 1 zeigt das Ergebnis der Infektionsversuche.

Tabelle 1. *Infektionsversuche mit Mycorrhizapilzen aus verschiedenen Pflanzen an Wurzeln von Hafer, Weizen, Roggen und Gerste*

	Sterile Wurzeln von				
	Hafer	Weizen	Roggen	Gerste	Kontrolle
M H	+	—	—	—	—
M W	—	+	+	—	—
M R	—	+	+	—	—
M G	—	—	—	+	—

Erklärung der Tabelle:

M H = mycorrhizahaltiger Schnitt aus Haferwurzeln

M W = mycorrhizahaltiger Schnitt aus Weizenwurzeln

M R = mycorrhizahaltiger Schnitt aus Roggenwurzeln

M G = mycorrhizahaltiger Schnitt aus Gerstewurzeln

Aus ihr geht zunächst hervor, daß die Synthese von mycorrhizahaltigen Pflanzenschnitten mit sterilen Pflanzenwurzeln unter bestimmten Bedingungen gelungen ist. Die unbeimpften Kontrollen blieben in jedem Fall negativ. Damit ist bewiesen, daß es sich bei meinem Versuch um den tatsächlichen Mycorrhizapilz handelte. Darüber hinaus ist folgendes zu ersehen: Der mycorrhizahaltige Schnitt aus Haferwurzeln hat nur beim Hafer eine neue Mycorrhiza bewirkt, hingegen nicht bei Weizen, Roggen und Gerste. Der mycorrhizahaltige Schnitt aus Weizenwurzeln erzeugte eine Infektion sowohl beim Weizen wie auch beim Roggen; Hafer und Gerste blieben steril. In gleicher Weise wurde durch mycorrhizahaltige Schnitte aus Roggenwurzeln sowohl Roggen wie auch Weizen infiziert; auch hier blieben Hafer und Gerste ohne Infektion. Der mycorrhizahaltige Schnitt aus Gerstenwurzeln konnte nur wieder bei der Gerste eine neue Mycorrhiza ausbilden, nicht bei Hafer, Weizen und Roggen. Eine Wiederholung des gesamten Versuches erbrachte das gleiche Ergebnis.

Der Versuch läßt vermuten, daß die Mycorrhizapilze für Hafer und Gerste artspezifisch sind. Die Mycorrhizapilze aus Weizen und Roggen sind offenbar identisch oder nahe verwandt. Mit diesem Ergebnis werden meine mikroskopischen Befunde bestätigt. Der Versuch zeigt also, daß innerhalb der Getreidearten nicht nur ein einziger Endophyt als Mycorrhizabildner auftritt, sondern daß auch hier weitgehende Artspezifität vorliegt. Meine Versuche sprechen gegen die Meinung von SIEVERS (1958) von der Identität der Mycorrhizapilze bei verschiedenen Pflanzenfamilien.

Der Einfluß von Umweltfaktoren auf die Mycorrhizabildung

Um die Biologie der Mycorrhiza weiterhin zu klären, versuchte ich, den Einfluß von Klimafaktoren wie Licht und Wasser auf die Mycorrhizabildung festzustellen. Anlaß hierzu gab eine Beobachtung, daß auf den von mir untersuchten Feldern die Wurzelverpilzung auf der Schattenseite hügeligen Geländes wesentlich schwächer war als auf der Sonnenseite. Auch war die Verpilzung hinter schattenspendenden Hecken und unter Bäumen deutlich geringer als an Stellen, die dem Licht stärker ausgesetzt waren wie z. B. Ackerrain. Bezüglich der Bodenfeuchtigkeit konnte ich nachweisen, daß auf feuchtem Boden ein stärkerer Verpilzungsgrad vorliegt als auf trockenem. Diese in der freien Natur erfolgte Beobachtung versuchte ich in Topf- und Feldversuchen experimentell zu erhärten.

1. Die Einwirkung verschiedener Belichtungsdauer

Methodik: 12 Mitscherlichgefäße wurden mit einem Erdgemisch aus Mutterboden mit Kompostzusatz beschickt. Unter Berücksichtigung meiner Ergebnisse über die Artspezifität der Mycorrhizapilze habe ich dann zu den einzelnen Töpfen etwa 2 gehäufte Hände voll wurzelhaltiger Erde von Feldern zugegeben, auf denen diejenigen Pflanzen gewachsen waren, die ich in den Töpfen züchten wollte (also für Hafer von Haferfeldern usw.). Wurzelstücke aus dieser Zusatzerde sind vorher mikroskopisch auf ihren Mycorrhizagehalt geprüft worden.

Nun erfolgte die Aussaat von Hafer-, Weizen-, Roggen- und Gerstekörnern in je 3 Versuchstöpfe. Nach etwa 10 Tagen lief das Getreide auf. Die 3 mit einer Getreideart besäten Töpfe wurden unterschiedlicher Belichtungsdauer ausgesetzt, derart, daß sie zu verschiedenen Zeitintervallen mit schwarzen papierumklebten Holzgestellen abgedeckt wurden. Die Versuche wurden bis zur Reife des Getreides beobachtet. Parallelversuche sind auf Versuchsparzellen durchgeführt worden, die durch Abdecken mit verdunkelten Mistbeetfenstern verschiedenen Belichtungszeiten ausgesetzt wurden.

Versuchsergebnisse: Tab. 2 gibt den Einfluß verschiedener Belichtungsdauer auf die Ausbildung der Mycorrhiza in Pflanzenwurzeln von Hafer, Weizen, Roggen und Gerste wieder.

Pflanzen mit 4 Std täglicher Belichtung zeigten naturgemäß die schwächste Entwicklung. Sie waren chlorophyllarm, dünn und schlaff. In ihren Wurzeln ließ sich nur eine geringe Mycorrhizaausbildung nachweisen. Pflanzen mit 8 Std täglicher Belichtung waren besser entwickelt und wiesen eine mittelgradige Verpilzung auf. Ganztags belichtete Pflanzen

waren voll entwickelt und stark verpilzt. Analoge Unterschiede konnte ich z. Zt. der Reife feststellen. Die wenig belichteten Getreidetöpfe zeigten bei ihren Pflanzen fehlende oder nur geringe Ährenbildung. Mit zunehmender Belichtung stieg der Ährenansatz der Pflanzen. Die parallel durchgeführten Freilandversuche hatten die gleichen Ergebnisse.

Tabelle 2. Die Einwirkung verschiedener Belichtungsdauer von Pflanzen auf die Mycorrhizabildung

	Belichtungszeiten		
	Ganztag = 12 Std	Halbtag = 8 Std	Vierteltag = 4 Std
Hafer	++ bis +++	++	+ bis ++
Weizen	+++	++	+
Roggen	++ bis +++	++	+
Gerste	+++	++	+ bis ++

Erklärung der Zeichen: + schwache Mycorrhizaverpilzung;
 ++ mittelgradige Mycorrhizaverpilzung; +++ starke Mycorrhizaverpilzung.

Die Ursache für die gute Mycorrhizaabildung bei längerer Belichtungszeit kann so erklärt werden, daß dem Pilz durch die längere Belichtung der Pflanze und der damit verbundenen besseren Assimilation Kohlenhydrate oder andere organische Stoffe geliefert werden, die für ihn existenznotwendig sind.

Tabelle 3. Mycorrhizaabildung bei verschiedenen Gramineenwurzeln zu Beginn der Vegetation und nach 3wöchiger Trockenperiode (letzte Spalte)

Ort	Pflanze	Datum	Verpilzungs- grad Anfang Mai	Datum	Verpilzungs- grad 3 Wochen später
Acker in Göttingen (hinter Hyg. Inst.)	Winter- gerste	7. 5. 1956	+	26. 5. 1956	—
Felder bei Göttingen	Gerste	5. 5. 1956	+++	26. 5. 1956	—
an der Jugend- herberge	Roggen	6. 5. 1956	++	26. 5. 1956	—
	Weizen	6. 5. 1956	+	26. 5. 1956	—
	Hafer	6. 5. 1956	+++	26. 5. 1956	—

2. Die Einwirkung verschiedener Bodenfeuchtigkeit

Zu Beginn der Hauptvegetationsperiode (Anfang Mai) wurden Wurzelschnitte von *Hafer*, *Weizen*, *Roggen* und *Gerste* aus verschiedenen Standorten angefertigt, um einen allgemeinen Überblick über die Mycorrhizaabildung zu gewinnen. Der gefundene Verpilzungsgrad geht aus Tab. 3 hervor. Sie zeigt, je nach untersuchtem Standort, einen schwachen bis guten Verpilzungsgrad in den Wurzeln.

Drei Wochen später (Ende Mai) untersuchte ich die gleichen Gramineenarten von den gleichen Standorten und mußte feststellen, daß der

Endophyt nicht mehr nachzuweisen war. Nur vereinzelt fand ich in den Parenchymzellen fein granulierte Hyphenreste. Das Ergebnis dieser Untersuchung findet sich ebenfalls in Tab. 3 (letzte Spalte).

Das gleiche Ergebnis fand ich in Paralleluntersuchungen an Wurzeln von *Bromus mollis*, *Allium porrum*, *Fragaria vesca*, *Brassica napus*, *Capsella bursa pastoris* und *Atriplex*.

Nach meiner oben beschriebenen Beobachtung vermutete ich, daß das Fehlen der Mycorrhizaausbildung auf eine zwischen den beiden Untersuchungsterminen liegende etwa dreiwöchige Trockenperiode zurückzuführen ist. Zur Bestätigung dieser Vermutung untersuchte ich daraufhin vergleichend die Mycorrhizaausbildung an Gramineenwurzeln von trockenen und feuchten Standorten des gleichen Feldes (Bachnähe oder Senken). Die Ergebnisse zeigt Tab. 4. Aus ihr geht hervor, daß die

Tabelle 4. Die Mycorrhizaausbildung in verschiedenen Gramineenwurzeln an trockenen und feuchten Stellen des gleichen Feldes sowie an den trockenen Stellen nach Regenperiode (letzte Spalte)

Ort	Pflanze	Datum	Verpilzungs- grad	Datum	Verpilzungs- grad nach Regen- periode ¹
feucht Jugend- herberge	Gerste	1. 6. 1956	+++		
trocken Jugend- herberge	Gerste	1. 6. 1956	—	8. 6. 1956	+++
feucht Domäne Scharzfels	Gerste	4. 6. 1956	++		
trocken Domäne Scharzfels	Gerste	4. 6. 1956	—	12. 6. 1956	+++
feucht Domäne Scharzfels	Hafer	4. 6. 1956	+++		
trocken Domäne Scharzfels	Hafer	4. 6. 1956	—	10. 6. 1956	+++
feucht Weende . .	Weizen	4. 6. 1956	+++		
trocken Weende . .	Weizen	4. 6. 1956	—	10. 6. 1956	+++
feucht Jugend- herberge	Roggen	4. 6. 1956	++		
trocken Jugend- herberge	Roggen	4. 6. 1956	—	8. 6. 1956	++
feucht Jugend- herberge	Weizen	4. 6. 1956	++		
trocken Jugend- herberge	Weizen	4. 6. 1956	—	8. 6. 1956	+++

¹ In drei weiteren, hier nicht aufgeführten Fällen wurde ebenfalls nach dieser Regenperiode kräftige Verpilzung festgestellt.

Mycorrhizaausbildung an feuchten Stellen durchweg mittelmäßig bis gut war, während sie an den trockenen Stellen des Ackers vollkommen fehlte.

Am 5. Juni setzte nach der vorangegangenen Trockenzeit eine Regenperiode ein. Nach meiner obigen Feststellung müßte nun auch an vorher trockenen Standorten eine Mycorrhizaausbildung zu beobachten sein. Wie ebenfalls aus Tab. 4 (letzte Spalte) hervorgeht, ist dieses tatsächlich

der Fall. Schon 3 Tage nach Einsetzen der Regenperiode fand ich auf sämtlichen untersuchten Feldern, auch an den vorher trockenen Stellen, mittelgradige bis starke Mycorrhizaausbildung.

Diese direkte Abhängigkeit der Stärke der Mycorrhizaausbildung von Trocken- und Regenperioden konnte ich im Laufe der gesamten Vegetationsperiode nachweisen.

In einem Freilandversuch, bei dem die Hälfte der Parzelle bei Regen durch Mistbeetfenster abgedeckt war und somit trocken blieb, während die andere Hälfte durch Begießen ständig feucht gehalten wurde, konnte ich die oben angegebenen Beobachtungen experimentell bestätigen.

In weiteren Topfuntersuchungen versuchte ich nun, quantitativ den optimalen Feuchtigkeitsgehalt für die Ausbildung der Mycorrhiza festzustellen.

Methodik: 48 Mitscherlichtöpfe wurden zunächst in der gleichen Weise angesetzt wie auf S. 297 (Versuch über verschiedene Belichtungsdauer). Vier weitere Töpfe blieben ohne Impferde und dienten als Kontrolle. In einem Vorversuch habe ich ermittelt, daß die

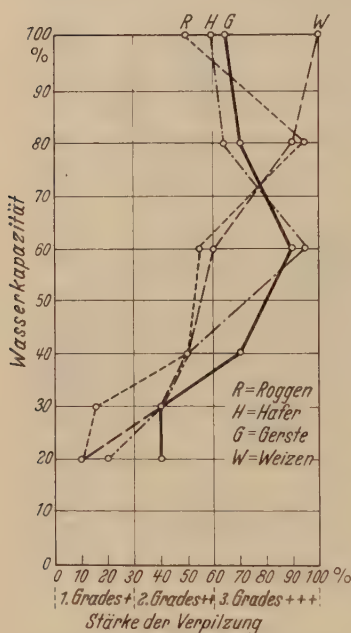


Abb. 8. Die Abhängigkeit der Stärke der Mycorrhizaausbildung vom Wasser- und Feuchtigkeitsgehalt des Bodens. Die Kreuze in der Abszissenbezeichnung bedeuten die in Tab. 2 angegebene Bonitierung

Wassersättigung der eingefüllten Bodenmenge je Versuchstopf bei 500 cm³ liegt. In je 12 Töpfe und 1 Kontrolltopf wurden jeweils 30 Körner von Hafer, Weizen, Roggen und Gerste eingesät. Zur Entwicklung der Pflanzenkeimlinge wurden die Töpfe täglich leicht besprengt. Als das Getreide aufgelaufen war, wurde jeder Topf mit verschiedenen abgemessenen Wassermengen begossen. Jeweils 2 Töpfe von Hafer, Weizen, Roggen und Gerste erhielten in 3-tägigen Abständen 100–500 cm³ Wasser. Das entspricht einer Kapazität von 20–100%. 5 Wochen nach Ansetzen des Versuches wurde die Stärke der Mycorrhizaausbildung an den Wurzeln beurteilt.

Versuchsergebnisse. Abb. 8 zeigt das Ergebnis. Bei allen 4 Gramineenarten läßt sich bei einer Wasserkapazität bis zu 30% nur eine spärliche Mycorrhizaausbildung beobachten. Hafer und Gerste zeigen die beste Mycorrhizaausbildung bei 60% der Wasserkapazität. Roggen hat

seine stärkste Verpilzung bei 80%; Weizen bei 80—100%. Die Versuche zeigen, daß bei den einzelnen Gramineenarten die stärkste Mycorrhiza-ausbildung bei einem für jede Art optimalen Feuchtigkeitsgrad vorhanden ist, was durch praktische Erfahrung des Getreideanbaues bekannt ist. Der Grund dieser unterschiedlichen Mycorrhiza-ausbildung bei verschiedener Bodenfeuchtigkeit ist sicherlich auf die damit verbundene bessere Assimilation der Pflanze zurückzuführen.

Zusammenfassung

1. Die Isolierung des Mycorrhizapilzes aus den Wurzeln von *Hafer*, *Weizen*, *Roggen*, und *Gerste* wurde unter Verwendung von Biomalz mit verschiedenen Zusätzen und Natursubstraten wie Wurzelpreßsaft, Wurzelbrei, Wurzelausscheidungen und anderem versucht. Zur Gewinnung von Wurzelausscheidungen war die Züchtung steriler Wurzeln Voraussetzung; hierzu wurde zum Oberflächensterilisieren von Getreidekörnern eine geeignete Apparatur entwickelt. Die Isolierung des Mycorrhizapilzes zur Züchtung in Reinkultur ist nicht gelungen. Es konnte jedoch ein gewisses Wachstum der Mycorrhizapilze unter Verwendung von Natursubstraten beobachtet werden. Die beste Wirkung auf das Hyphenwachstum zeigten Ausscheidungsstoffe steriler Wurzeln.

2. Eine gewisse Artspezifität der Mycorrhizapilze war nach mikroskopisch feststellbaren morphologischen Unterschieden der Hyphen und ihrer Eintrittspforten bei den untersuchten 4 Gramineenarten zu vermuten. Eine Synthese der Mycorrhiza durch Zusammenbringen von mycorrhizahaltigen Schnitten mit sterilen Pflanzenwurzeln ist unter gewissen Bedingungen möglich. Mycorrhizahaltige Schnitte von Haferwurzeln erbrachten nur bei Hafer eine neue Mycorrhiza, solche aus Gerstenwurzeln nur bei Gerste. Mycorrhizahaltige Schnitte von Roggenwurzeln erzeugten sowohl bei Roggen als auch bei Weizen eine neue Mycorrhiza und umgekehrt. Danach sind die Mycorrhizapilze für Hafer und Gerste offenbar artspezifisch und die für Weizen und Roggen identisch oder nahe verwandt.

3. Die Stärke der Mycorrhizabildung ist direkt proportional der Belichtungsdauer, offenbar infolge der damit verbundenen besseren Assimilation und Belieferung des Pilzes mit organischen Stoffen. Die stärkste Mycorrhizabildung tritt bei einem für jede Pflanzenart optimalen Feuchtigkeitsgrad ein, für Hafer und Gerste bei 60% der Wasserkapazität des Bodens, für Roggen bei 80% und für Weizen bei 80—100%. Auch hierfür dürfte der Grund in der mit dem Feuchtigkeitsgrad verbundenen besseren Assimilation zu suchen sein.

Herrn Prof. Dr. A. RIPPEL-BALDES danke ich für die Anregung zur vorliegenden Arbeit und seine Ratschläge bei ihrer Durchführung.

Ausgeführt mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

Literatur

ADAMETZ, I.: Inaug. Diss. Leipzig 1886. — ASAI, T.: Jap. J. of Bot. **7**, 107 (1934).

BERNARD, N.: C. R. Acad. Sci. (Paris) **131**, 626 (1900); Ann. Sci. natur. bot. 9. sér., **14**, 235 (1911). — BLAIR, I. D.: New Zealand J. Sci. Technol. Sect. **26**, 258 (1945). — BOULLARD, B.: Extr. du Bull. de la Soc. bot. Fr. **100**, 75 (1953). — BOUWENS, H.: Zbl. Bakt., II. Abt. **97**, 34 (1937). — BURGEFF, H.: Manual of Pteridology. The Hague 1938.

CHESTERS, C. G. C.: Trans. Brit. Mycol. Soc. **24**, 352 (1940). — CIFERRI, R.: Phytopathology **18**, 249 (1928). — COSTANTIN, J.: C. R. Acad. Sci. (Paris) **178**, 158 (1924); **198**, 1195 (1934).

DEMETER, K.: Flora **116**, 406 (1923). — DOBBS, C. G., and W. H. HINSON: Nature (Lond.) **172**, 197 (1953). — DOMINIK, T.: Rev. appl. Myc. **26**, 462 (1947); **27**, 535 (1948); **29**, 160, 167, 223 (1950).

FRANK, A. B.: Ber. dtsch. bot. Ges. **3**, 128 (1885). **9**, 244 (1891). — FREISLEBEN, R.: Jb. Bot. **80**, 421 (1934); **82**, 413 (1935).

GALLAUD, I.: Rev. gén. Bot. **17**, 5 (1905). — GARRETT, S. D.: Biology of root-infecting fungi. Cambridge University Press 1956. — GERDEMANN, J. W.: Mycologia (N. Y.) **47**, 619 (1955).

HARRISON, R. W.: Nature (Lond.) **175**, 432 (1955). — HATCH, A. B.: J. Forestry **34**, 22 (1936); Forest Bull. **6** (1937). — HOPF, M.: Arch. Mikrobiol. **14**, 661 (1950). — HOWARD, A.: Mein landw. Testament. Siebeneicherverlag Berlin-Charlottenburg-Frankfurt/M.: 1948. — HÖVELER, W.: Jb. Bot. **24**, 283 (1892).

JANSE, J. M.: Ann. Jard. Bot. Buitenzorg. **14**, 53 (1896). — JONES, F. B.: J. Agric. Res. **29**, 459 (1924).

KAMIENSKI, F.: Botan. Ztg. **39**, 457 (1881). — KELLEY, A. P.: Mycotrophy in plants. Waltham, Mass: Chronica Botanica 1950. — KUKLINA-KHRUSHEVA, E. P.: Sovetsk. agron. **10**, 47 (1952).

LEGGE, B.: Nature (Lond.) **169**, 759 (1952). — LEVISOHN, I.: Nature (Lond.) **174**, 408 (1954); **172**, 316 (1953). — LINFORD, M. B.: Soil Sci. **53**, 93 (1942). — LIHNELL, D.: Symb. Bot. Upsalienses **3**, Heft 3 (1939).

MAGNUS, W.: Jb. Bot. **35**, 205 (1900). — MAGROU, J.: Ann. Sci. Nat. Bot. Sér. X, **3**, 181 (1921); C. R. Acad. Sc. **201**, 1038 (1935); **203**, 887 (1936); Ann. Sci. Nat. Bot., Sér. X, **19**, 359 (1937). — MARCUS, O.: Arch. Mikrobiol. **13**, 1 (1942). — MARTIN, P.: Arch. Mikrobiol. **29**, 154 (1958). — MCLUCKIE, J., and A. BURGESS: Proc. Linnean Soc. N. S. Wales. **57**, 291 (1932). — MELIN, E., u. H. NILSSON: Svensk. Bot. Tidskr. **46**, 281 (1952). — METZ, H.: Arch. Mikrobiol. **23**, 297 (1955). — MOSSE, B.: Ann. of Bot. N. S. **20**, 349 (1956). — MOSTAFA, M. A.: Ann. of Bot. **2**, 481 (1938).

NILSSON, P. E.: Arch. Mikrobiol. **26**, 285 (1957).

OUDEMANS, C. A. J. A., u. C. J. KONING: Arch. neerl. Sci., Nat. Ser. 2, **7**, 266 (1902).

PEUSS, H.: Arch. Mikrobiol. **29**, 112 (1958). — PEYRONEL, B.: Boll. mens. R. Staz. Pat. veg. Roma **3**, 43 (1922); **5**, 73 (1924). — Soc. Intern. Microb. Sez. Ital. **4**, 483 (1932).

RAYNER, M. C.: Mycorrhiza. Cambridge, University Press. 1927. — RIPPEL, A.: Der Forschungsdienst, **1**, 28 (1936). — Handbuch d. Bodenlehre, **1**, Erg. Bd., 440 (1939). — RUSSEL, E. J.: Soil conditions and plant growth. London: Green and Co. 1949.

SCHLICHT, A.: Landw. Jahrb. **18**, 477 (1889). — SCHWARTZ-KRAEPELIN, H.: Z. Naturforschg. **2b**, 450 (1947). — SEWELL, W. F.: Nature (Lond.) **177**, 708 (1956). — SIEVERS, E.: Arch. Mikrobiol. **18**, 289 (1953); **29**, 101 (1958). — STAHL, E.: Jb. Bot. **34**, 539 (1900). — STAHL, M.: Planta **37**, 103 (1949). — STRZEMSKA, J.: Ann. Univ. M. Curie-Sklodoswka, Sectio E. **4**, 9 (1949); Russ. Mikrobiology **20** (2), 120 (1951); Acta microbiol. pol. Vol. I, **1**, 24 (1952); II, **4**, 297 (1953); IV, **3**, 183 (1955).

TIMONIN, M. I.: Canad. J. Res., C. **18**, 307 (1940).

WALLACE, R. H., and A. G. LOCHHEAD: Canad. J. Res., C **28**, 1 (1950). — WARCUP, J. R.: Nature (Lond.) **166**, 117 (1950). — WEISSFLOG, J.: Planta **19**, 170 (1953). — WILSON, J. K.: Amer. J. Bot. **2**, 420 (1915). — WINTER, A. G.: Phytopath. Zeitschr. **17**, 421 (1951); **18**, 221 (1952); Pflanzenernährung, Düngung, Bodenkunde **60**, 221—243 (1953).

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Virusforschung
der Biologischen Bundesanstalt, Braunschweig)

Spektralphotometrische Untersuchungen am Tabakmosaik-Virus

Von

H. L. PAUL

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 20. März 1958)

Beim Tabakmosaik-Virus (TMV) sind die Verhältnisse der Lichtabsorption des intakten Virusteilchens, sowie die seines Proteins und seiner Nucleinsäure verschiedentlich untersucht worden. Aus den Ergebnissen dieser spektralphotometrischen Versuche ließen sich Rückschlüsse auf die Zusammensetzung und den Bau der Viruspartikeln ziehen. Außer zu solchen qualitativen Untersuchungen kann das Spektralphotometer mit Vorteil auch noch zur Bestimmung der Konzentration des Virus in einer Suspension benutzt werden, wenn es in genügend reiner Form vorliegt. Diese Art der quantitativen Messung hat neben ihrer Empfindlichkeit den Vorteil, die Infektiosität des Materials nicht merkbar zu beeinträchtigen.

In der vorliegenden Arbeit galt es, die verschiedenen spektralphotometrischen Daten an einem TMV-Stamm zu gewinnen, um sie dann miteinander in Beziehung setzen zu können. Neben den qualitativen Versuchen und ihrer Deutung wurden auch Meßkurven für Konzentrationsbestimmungen an nativem und hydrolytisch gespaltenem Virus aufgestellt. Schließlich wurde eine einfache Methode zum Abschätzen des Nucleinsäuregehaltes bzw. zur Beurteilung der Reinheit einer Präparation angegeben. Ein Teil der Daten, die hier für unseren TMV-Stamm ermittelt wurden, findet sich für andere Stämme zwar schon in der Literatur, jedoch so verstreut, daß eine geschlossene Darstellung an einheitlichem Material und ein Vergleich mit den bekannten Werten nützlich erschien.

Material und Methodik

Untersucht wurde ein starker Stamm des gewöhnlichen TMV, der aus systemisch kranken Blättern von Samsuntabak nach folgendem Schema rein dargestellt wurde:

Blätter einfrieren, homogenisieren in Phosphatpuffer vom p_H 7, Homogenisat mit Chloroform-Butanol (6 : 1) behandeln,

↓
Überstand mit Essigsäure (10%ig) bei p_H 3,5 fällen, zentrifugieren, Sediment lösen, neutralisieren, zentrifugieren

↓
Überstand mit $\frac{1}{3}$ gesätt. Ammonsulfatlösung fällen, zentrifugieren

↓
Sediment lösen, neutralisieren, gegen Wasser dialysieren, zentrifugieren

↓
Überstand 45—60 min bei $65\,000 \times g$ ultrazentrifugieren }
↓
Sediment lösen, 30—60 min bei $7\,000 \times g$ zentrifugieren } meistens 3 Cyclen

↓
Überstand etwa 2 Tage dialysieren, 30 min bei $7\,000 \times g$ zentrifugieren

↓
Überstand: Präparat, etwa $\frac{1}{100}$ der ursprünglichen Blattsaftmenge.

Der Stickstoff (N) wurde nach der Mikromethode von Kjeldahl, der Phosphor (P) nach einer etwas geänderten Methode von SPERRY (1942) bestimmt. Die hydrolytischen Spaltungen des TMV erfolgten in $1n\text{-HClO}_4$ bei 80°C innerhalb 30 min. Das gefällte Protein wurde abzentrifugiert und das Hydrolysat gegebenenfalls neutralisiert und gepuffert. Wie P-Analysen zeigten, verlief die Spaltung unter diesen Bedingungen vollständig, und ohne daß größere Mengen Eiweiß in Lösung gingen. Die Nucleinsäure (NS) des TMV wurde mit Phenol nach der Methode von SCHUSTER, SCHRAMM u. ZILLIG (1956) isoliert.

Zu Kontrollzwecken zogen wir ein Hefe-NS-Handelspräparat (Schuchardt, München) heran, das nach dem Verfahren von VISCHER u. CHARGAFF (1948) gereinigt worden war.

Die Messungen wurden mit dem Spektralphotometer M4Q von Zeiß durchgeführt, und als Maß für die Absorption der Absorptionskoeffizient ϵ_P bezogen auf ein Grammatom Phosphor benutzt (CHARGAFF u. ZAMENHOFF 1948). Die Lichtstreuung der TMV-Suspension ließ sich nach dem Rayleighschen Gesetz errechnen, nachdem der Wert des Exponenten der Wellenlänge nach der Methode von TREIBER u. SCHAUENSTEIN (1949) ermittelt worden war. Aus der Differenz von Absorption und Streuung ergab sich der Wert der reinen Absorption $\epsilon_{P\text{rein}}$.

Ergebnisse

Vermessungen von nativem TMV

Die Absorptionskurve des TMV in Phosphatpuffer vom p_H 7 ist in Abb. 1 Kurve a) dargestellt. Ihre Werte ergaben sich aus der Vermessung 26 verschiedener Präparationen. Das Maximum liegt bei $260\text{ m}\mu$, das Minimum bei $248\text{ m}\mu$. Sowohl bei $280\text{ m}\mu$ als auch bei $290\text{ m}\mu$ zeigten die meisten der einzelnen Meßkurven leichte Einbiegungen, die vom Proteinanteil des Virus herrühren. Sie treten in der Kurve a) jedoch nicht in Erscheinung, da sie nicht immer genau an der gleichen Stelle lagen und so bei der Bildung der Mittelwerte verwischt wurden. Zur weiteren Charakterisierung der Absorptionsverhältnisse lassen sich die Quotienten

$E_{280/260}^*$ und $E_{\max/\min}$ verwenden. In dem ersteren werden die Wellenlängen benutzt, bei denen die Absorptionsmaxima des Protein- bzw. des NS-Anteiles des TMV liegen und es wird noch zu diskutieren sein, welche Auswertungsmöglichkeiten dieses Quotienten bestehen. Schließlich kann

noch die Lage des Absorptionsminimums zur Beurteilung herangezogen werden.

Wichtig ist, daß das Virus in einem Medium von definiertem p_H - und Ionenkonzentrationswert untersucht wird.

Es wurde deswegen immer $\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer vom p_H 7 verwendet. Dest. Wasser ($p_H \sim 5,9$) bewirkt z. B. eine leichte Erhöhung des Quotienten $E_{\max/\min}$.

Auf die kräftige Lichtstreuung der TMV-Suspensionen ist mehrfach hingewiesen worden. Sie muß berücksichtigt werden, wenn die reine Lichtabsorption ermittelt werden soll. Da aber die TMV-Partikeln nach Form und Größe die Bedingungen des Rayleighschen Gesetzes nicht voll erfüllen, darf nicht ohne weiteres der Exponent 4 bei der Berechnung benutzt, sondern muß für jedes Präparat bestimmt werden. Im Mittel und auch in speziellen Meßreihen ergab sich für ihn der Wert 3,6.

Die Kurve der reinen Absorption zeigt Abb. 1 Kurve *b*. Ein Vergleich der Kurven *a* und *b* läßt den hohen Beitrag, den die Lichtstreuung liefert, deutlich erkennen, und ebenso fällt die Verschiebung des Maximums nach $\lambda = 266 m\mu$ auf. Da die Lichtstreuung mit fallender Wellenlänge

stark ansteigt, ist ferner das Minimum ausgeprägter als in der Kurve *a*. Die für die Kurven *a* und *b* erhaltenen Daten und Charakteristika sind in Tab. 1 zusammengefaßt und veranschaulichen die Unterschiede zwischen beiden Kurven.

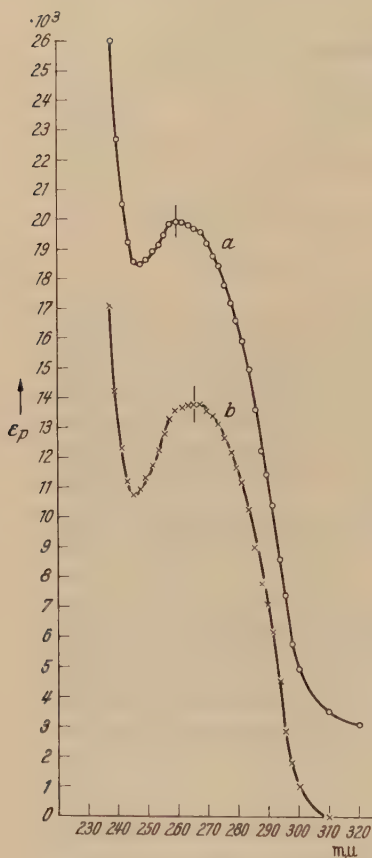


Abb. 1. Absorptionskurven von TMV-Suspensionen. Kurve *a* Gesamtabsorption; Kurve *b* reine Absorption

* $E_{280/260}$ heißt $\frac{\text{optische Dichte bei } 280 m\mu}{\text{optische Dichte bei } 260 m\mu}$

Anstatt auf den P-Gehalt kann die Absorption auch auf die Konzentration des Virus (g TMV/l) bezogen werden. Da für unsere Präparate das N/P-Verhältnis $30,2 \pm 1,5$ betrug und das Verhältnis TMV/N = 6,06 ist (TAKAHASHI 1951), ergibt sich für $\alpha_{\max}^{0,1\%} = 3,49$ und für $\alpha_{\text{rein}}^{0,1\%} = 2,42$.

Tabelle 1. Charakteristische Werte für die Absorption des nativen TMV

	Gesamtabsorption	„reine“ Absorption
Maximum, Lage und Höhe	$\epsilon_{P_{260}} = 19800 \pm 450^*$ bzw. $\alpha_{260}^{0,1\%} = 3,49$	$\epsilon_{P_{\text{rein } 260}} = 13700 \pm 400^*$ bzw. $\alpha_{\text{rein } 260}^{0,1\%} = 2,42$
Minimum, Lage und Höhe	$\epsilon_{P_{348}} = 18400$	$\epsilon_{P_{\text{rein } 348}} = 10800$
$E_{280/260}$	$0,830 \pm 0,004^*$	0,86
$E_{\max/\min}$	1,07	1,27
Exponent der Wellenlänge im Rayleighschen Gesetz	—	3,6
* mittlerer Fehler.		

Vermessungen von TMV-Hydrolysaten

Durch eine saure Hydrolyse kann das TMV in seinen NS- und Proteinanteil gespalten werden. Interessant ist es, die Änderung des Quotienten $E_{280/260}$ während dieser Behandlung zu verfolgen. Die Ergebnisse solcher Versuche sind in Abb. 2 dargestellt. Hierbei gilt die Kurve *a* für neutralisierte Hydrolysate, während die Kurve *b* die Verhältnisse in 1n-HClO₄

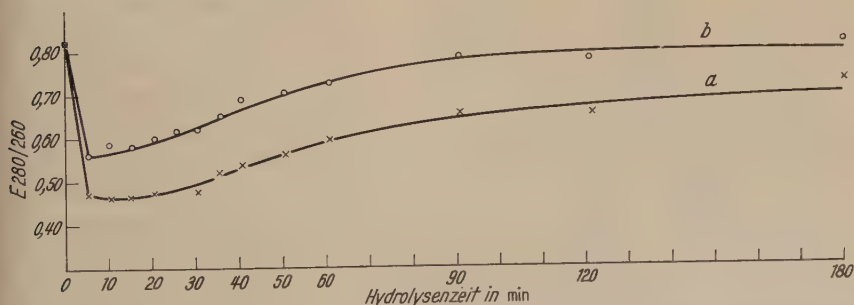


Abb. 2. Änderungen des Wertes $E_{280/260}$ während der Hydrolyse. Kurve *a* neutralisiertes Hydrolysat; Kurve *b* Hydrolysat in 1n-HClO₄

zeigt. Etwa folgende Deutung könnte gegeben werden: zuerst wird das Virus durch die Säure gefällt, das Protein denaturiert und die NS abgetrennt. Dabei geht in neutralisierten Hydrolysaten (Kurve *a*) der Wert $E_{280/260}$ auf etwa 0,47 zurück. Er ähnelt somit den Quotienten für reine

TMV-NS bzw. Hefe-NS ($E_{280/260} = 0,48$ bzw. $0,46$). Nach einiger Zeit steigt der Wert wieder an, was zunächst eine Folge der Säureeinwirkung auf die NS sein dürfte, da auch bei reiner Hefe-NS ein leichter Anstieg des Quotienten von $0,46$ auf etwa $0,52$ während der ersten 30–40 min zu bemerken war. Daneben spielt beim TMV-Präparat die Löslichkeit des

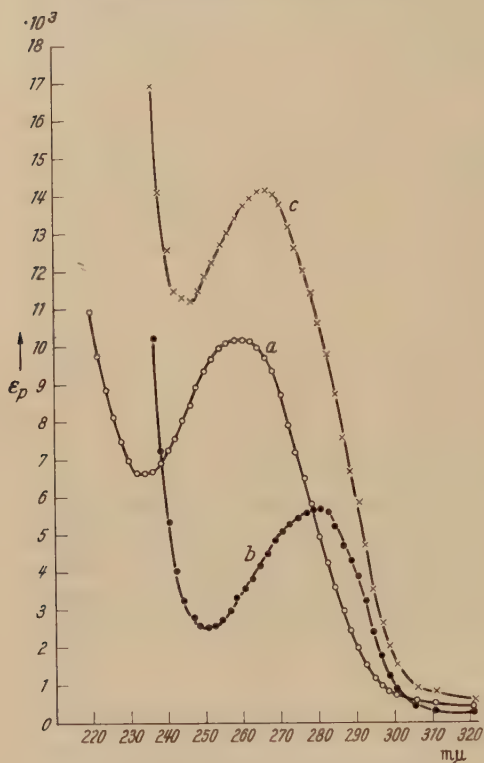


Abb. 3. Ergebnisse der Hydrolysenversuche.

Kurve *a*: NS in neutralisiertem Hydrolysat: $E_{280/260} = 0,485$, $E_{\text{max/min}} = 1,54$; Kurve *b*: ausgefällt Protein gelöst, neutralisiert: $E_{280/260} = 1,61$, $E_{\text{max/min}} = 2,28$; Kurve *c*: Additionskurve aus *a* + *b*: $E_{280/260} = 0,77$; $E_{\text{max/min}} = 1,26$

Die Vermessung der NS ergab die Kurve *a*, diejenige des Proteins die Kurve *b*. Ihre charakteristischen Werte sind unter der Abb. 3 zu finden. Die Kurve *c* entsteht durch Addition von *a* und *b* und ist mit der Kurve der reinen Absorption praktisch identisch. Ob die leichte Erhöhung des Maximums als reell angesehen werden kann, soll noch besprochen werden.

Versuche mit isolierter TMV-NS

Isolierungen der TMV-NS mit Phenol brachten für unser Material im Mittel die in Tab. 2 angegebenen Daten. Die einzelnen Versuche zeigten

Proteins in 1n-HClO₄ eine Rolle (vgl. LOGAN, MANNELL u. ROSSITER 1952). Sie tritt deutlich in Erscheinung in dem ständigen Anwachsen des Quotienten beim TMV, während dies bei reiner Hefe-NS nach etwa 30 min nicht mehr geschieht. Neutralisiert man das Hydrolysat nicht, dann ergibt sich die Kurve *b* der Abb. 2. In diesem Falle ändert sich der $E_{280/260}$ -Wert auch noch infolge der pH-Verschiebung und beträgt bei 30 min Behandlungszeit $0,71$ für TMV. Für Hefe-NS bzw. TMV-NS lag er dann bei $0,66$ bzw. $0,60$.

Abb. 3 zeigt die Ergebnisse einiger Hydrolysenversuche, wobei die Phosphorwerte des Materiales vor der Hydrolyse zur Berechnung benutzt wurden. Die Hydrolysate wurden neutralisiert und das ausgefällt Protein nach den Angaben von SCHRAMM u. DANNENBERG (1944) gelöst.

allerdings oft deutliche Abweichungen voneinander. Da die Abhängigkeit der ε_p -Werte von der Vorbehandlung bekannt ist, wurde die TMV-NS weiterverarbeitet. Abb.4 gibt das Resultat eines solchen Versuches wieder. In diesem Falle hatte die frisch mit Phenol isolierte NS einen ziemlich niedrigen ε_p -Wert. Wurde sie anschließend nach dem Verfahren von FRAENKEL-CONRAT, SINGER u. WILLIAMS (1957) umgefällt, so erhöhte er sich. Eine weitere, leichte Steigerung der Absorption war zu bemerken, wenn das NS-Präparat längere Zeit bei Zimmertemperatur stehen gelassen wurde. Schließlich konnte dann durch eine Hydrolyse mit Perchlorsäure ein ε_p -Wert von 9500—10000 erzielt werden. Bei diesen Verhältnissen ist es schwer, einen allgemein gültigen Betrag für die Erhöhung der Absorption durch die Hydrolyse anzugeben, doch dürfte er zwischen 15 und 25% liegen. Abgesehen von den ε_p max-Werten ändern sich auch noch andere Charakteristica der Kurven, wie aus dem Text zu Abb.4 zu ersehen ist.

Tabelle 2. Spektralphotometrische Daten frisch isolierter und hydrolysierter TMV-NS

	frisch isolierte NS m in $\frac{1}{150}$ Phosphat pH 7	hydrolysierte NS in 1n-HClO ₄
Maximum bei . .	258 m μ	262 m μ
Minimum bei . .	230 m μ	230 m μ
ε_p max	7850	9450
ε_p min	3650	3600
$E_{230/260}$	0,48	0,6
$E_{max/min}$	2,15	2,62
Stickstoff/Phosphor	$\sim 1,8$	—

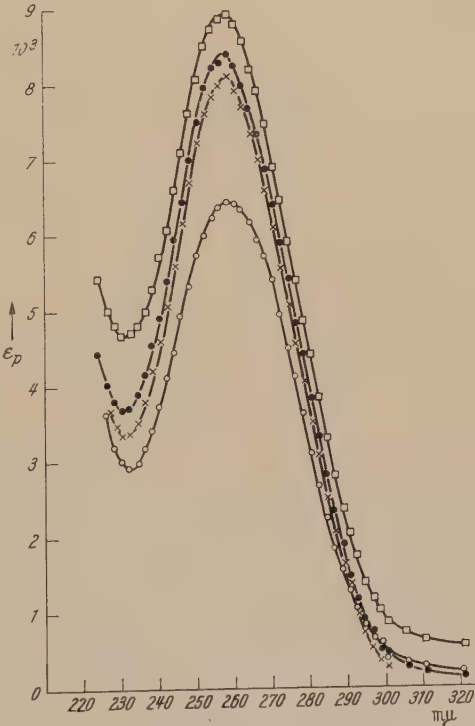


Abb.4. Der Einfluß der Vorbehandlung auf die Höhe der ε_p -Werte von TMV-NS

	$E_{230/260}$	$E_{max/min}$
○ = frische Phenolisolierung	0,484	2,19
× = Phenolisolierung, 1 mal umgefällt	0,446	2,41
• = Umfällung, nach 24 Std Aufbewahrung	0,502	2,28
□ = Umfällung, nach 48 Std Aufbewahrung	0,465	1,91

Die Bestimmung des NS-Gehaltes des TMV und der Konzentration einer TMV-Suspension

WARBURG u. CHRISTIAN (1942) entwickelten für Enzymstudien eine Methode, mit der sie aus dem $E_{280/260}$ -Wert den Protein- bzw. NS-Gehalt bestimmten. Sie gestattet, wenn die spektralphotometrischen Daten für die NS und das Protein bekannt sind, relativ genaue Bestimmungen bis zu einem Gehalt von etwa 25% NS. Dieses außerordentlich einfache und

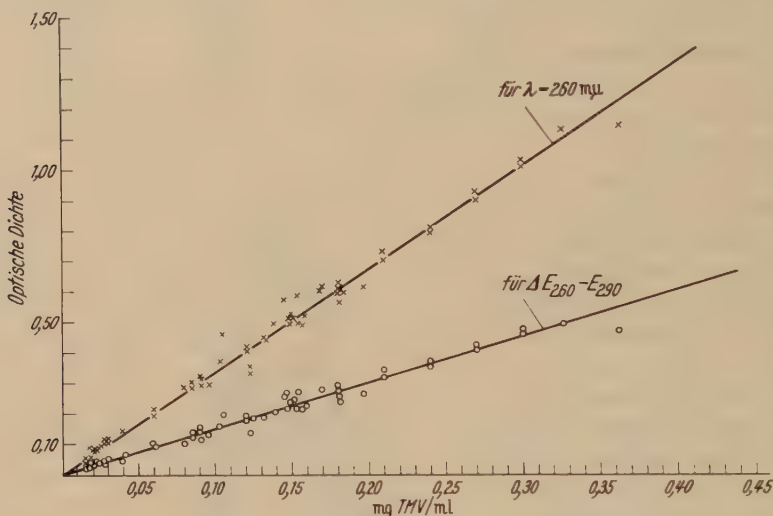


Abb. 5. Die Absorption von nativem TMV in Suspensionen verschiedener Konzentration.

Medium: $\frac{m}{15}$ Phosphatpuffer, pH 7; 1 cm-Cuvetten

schnelle Verfahren läßt sich auch auf Virussuspensionen¹ anwenden, sofern es nicht auf große Genauigkeit ankommt bzw. der NS-Gehalt nicht zu hoch ist. Der Wert $E_{280/260} = 0,83$ für TMV entspricht einem NS-Gehalt von 6,5%. Genauere Bestimmungen müssen allerdings mit dem Quotienten $E_{280/260}$ für die reine Absorption ausgeführt werden. Er beträgt für unser Material 0,86 und entspricht 6% NS. Das stimmt gut mit unseren chemischen Analysen überein, aus denen sich ein NS-Gehalt von 5,5–6% ergab. Ist der Wert $E_{280/260}$ für das reine Virus bekannt, dann kann während der Präparation seine Höhe als Kontrolle für den Reinheitsgrad benutzt werden.

Sehr einfach ist auch die Bestimmung der Konzentration einer TMV-Suspension durch Messen ihrer optischen Dichte bei 260 mμ, wobei die Lichtstreuung unberücksichtigt bleibt (TAKAHASHI 1951; TROXEL 1953).

¹ Über die generelle Anwendbarkeit bei Viruspräparationen soll noch an anderer Stelle ausführlich berichtet werden.

Allerdings darf, wenn das Ergebnis nicht verfälscht werden soll, die Absorption bei $\lambda = 320 \text{ m}\mu$ den Wert von $E = 0,06$ nicht übersteigen. Ist das doch der Fall, so lassen sich oft noch richtige Resultate gewinnen, wenn die Differenz der optischen Dichten bei 260 und 290 $\text{m}\mu$ als Maß genommen wird. Beide Meßgeraden sind in Abb. 5 für natives TMV angegeben. Bei solchen Bestimmungen ist es zweckmäßig, die Verdünnung

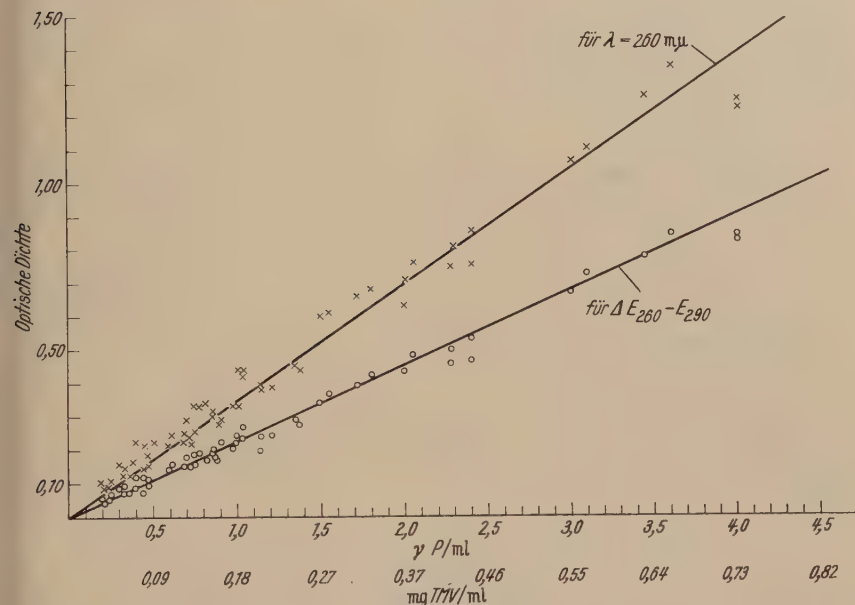


Abb. 6. Die Absorption von TMV-Hydrolysaten. Medium: 1 n-HClO₄; 1 cm-Cuvetten

des Materials so zu wählen, daß man im optimalen Meßbereich des Spektralphotometers von $E = 0,20$ — $0,60$ bleibt (HISKEY 1957).

In Fällen, in denen kein sauberes Viruspräparat vorliegt, kann mitunter durch Vermessen eines Hydrolysates eine Konzentrationsbestimmung durchgeführt werden. Voraussetzung ist, daß keine Substanzen mit spezifischer Absorption im Meßbereich in das Hydrolysat gelangen können. Abb. 6 zeigt die Geraden für $\lambda = 260 \text{ m}\mu$ und $\Delta E_{260} - E_{290}$ für Perchlorsäurehydrolysate bei einer Messung in 1 n-HClO₄. Bemerkenswert erscheint dabei, daß für $\lambda = 260 \text{ m}\mu$ die E-Werte nur etwa halb so groß sind wie bei nativem TMV, wenn man eine Steigerung der Absorption um 17% während der Hydrolyse in Rechnung setzt.

Der Fehler der spektralphotometrischen Konzentrationsmessung liegt bei etwa 3—5% für gereinigtes Virus; für Hydrolysate schätzungsweise bei 5—7%.

Tabelle 3. *Spektralphotometrische Daten*

Objekt	Gesamtabsorption				reine
	Maximum Lage + Höhe	Minimum Lage + Höhe	$E_{260/266}$	$E_{\max/\min}$	Maximum Lage + Höhe
TMV nativ	$\varepsilon_{p\ 260} = 19800$ ± 450 $\alpha_{260}^{0,1\%} = 3,49$	$\varepsilon_{p\ 266} = 18400$	0,830	1,07	$\varepsilon_{p\ \text{rein}\ 266} =$ 13700 ± 400 $\alpha_{\text{rein}\ 266}^{0,1\%} = 2,42$
	$\alpha_{260}^{0,1\%} = 3,38$				
	$\alpha_{265}^{0,1\%} = 2,2$ $\alpha_{265}^{0,1\%} = 4,7$	bei $\lambda =$ 248 m μ			
	$\alpha_{265}^{0,1\%} = 2,88$				$\alpha_{\text{rein}\ 265}^{0,1\%} = 2,22$
					$\alpha_{\text{rein}\ \max}^{0,1\%} =$ 2,25—2,60
	$\varepsilon_{p\ 260} = 17000$				$\varepsilon_{p\ \text{rein}\ 266} = 14400$
	$\alpha_{\max}^{0,1\%} = 2,9$		0,83—0,84		
			0,76—0,82*	1,12	
TMV re- kombi- niert				1,17	

Diskussion

Das TMV gehört zu den Viren, die auch hinsichtlich ihrer Lichtabsorption häufiger untersucht worden sind. Es ist daher angezeigt, die schon bekannten Daten mit den hier erhaltenen zu vergleichen. Wie Tab. 3 zeigt¹, stimmen die Angaben über die Lage von Maximum und Minimum in allen Fällen gut überein, wobei allerdings manchmal das Maximum relativ breit sein kann. Die Höhe des Maximums hingegen unterliegt beträchtlichen Schwankungen. Das mag zum Teil seinen Grund in Verschiedenheiten der TMV-Stämme haben. Eine größere Rolle spielt aber sicher die Präparation und der sich aus ihr ergebende Aggregatzustand, der sich auf den Betrag der Lichtstreuung auswirkt. Von den Werten für die reine Absorption kann man dagegen erwarten, daß sie gleichförmiger ausfallen und daß Unterschiede zwischen ihnen weniger künstlich entstanden sein könnten. Doch sind die Angaben darüber leider zu spärlich, um eingehendere Vergleiche anstellen zu können.

¹ Die Tabelle erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

für TMV, TMV-NS und TMV-Protein

Absorption			Referenz
Minimum Lage + Höhe	$E_{\text{rein } 280/260}$	$E_{\text{rein max/min}}$	
$\epsilon_{P_{\text{rein } 280}} =$ 10800	0,86	1,27	eigene Werte
			WILLIAMS, BACKUS u. STEERE 1951
			LAVIN, LORING u. STANLEY 1939
			SCHRAMM u. DANNENBERG 1944
	0,81—0,89*	1,41—1,47*	DANNENBERG, SCHRAMM u. FLAM- MERSFELD 1948
$\epsilon_{P_{\text{rein } 280}} =$ 12290			REDDI 1957
			COMMONER, MERCER, MERRILL u. ZIMMER 1950
			GINOZA u. ATKINSON 1955
			FRAENKEL-CONRAT u. WILLIAMS 1955

* Diese Werte wurden aus den angegebenen Daten errechnet.

Der Quotient $E_{280/260}$ blieb in den eigenen Versuchen sehr gleichförmig und findet sich auch von anderen Autoren bestätigt. Der $E_{\text{max/min}}$ -Wert hingegen schwankte stärker und scheint von den Bedingungen während der Präparation abhängiger zu sein. Eine besondere Bedeutung hat die Größe $E_{\text{rein } 280/260}$ zur Bestimmung des NS-Gehaltes bzw. der Reinheit eines Präparates. Im Falle des TMV ist diese Bestimmung auch recht genau ausführbar.

Inwieweit dieser Quotient generell als Charakteristikum für TMV-Präparationen dienen kann, muß noch genauer geprüft werden, denn Präparate aus Blättern verschiedener Insertionen und unterschiedlich gewachsener Pflanzen könnten unter Umständen nur einen Durchschnittswert geben. Wie ZECH u. VOGT-KÖHNE (1956) gezeigt haben, scheint der NS-Gehalt von TMV-Teilchen verschiedener Entwicklungsstadien zu variieren, was sich natürlich auch in einer Veränderung des Quotienten ausdrücken müßte.

Die schlechte Reproduzierbarkeit der ϵ_P -Werte von Nucleinsäuren ist bekannt. So kann es nicht Wunder nehmen, daß auch für die TMV-NS recht unterschiedliche Angaben vorliegen (siehe Tab.3). Die eigenen

Tabelle 3

Objekt	Absorption			
	Maximum Lage + Höhe	Minimum Lage + Höhe	$E_{280/260}$	$E_{\max/\min}$
TMV-NS	$\epsilon_{258} = 7850$ (Mittel) Schwankungen von 6500—9000	$\epsilon_{P230} = 3650$	0,48	2,15
	$\alpha_{260}^{0,1\%} = 30$			
	$\epsilon_{p\max} = 6400$ bis 6700*			
	$\epsilon_{258} = 8300$			
	$\epsilon_{258} = 9600$			
	$\epsilon_{258} = 9000$			
	$\alpha_{258}^{0,1\%} = 25$ $\epsilon_p = 9300^*$	tiefes Minimum bei 228 m μ	0,50	3,0—3,1
			0,50	2,7—3,0
TMV- Protein	$\alpha_{280} = 1,3$	bei 250 m μ		
			1,54	2,4
				2,4—2,5
	$\alpha_{282}^{0,1\%} = 1,27$ $\alpha_{282}^{0,1\%} = 1,05$	für: TMV-Protein für: Holmes rib grass-Protein		2,6—3,0

Ergebnisse wiesen Schwankungen auf, die sich im Rahmen der bereits aus der Literatur bekannten Werte halten. Sie zeigen ferner, daß die Präparation und das Alter der NS von Bedeutung sind, da durch diese Faktoren der Aggregationszustand des NS-Makromoleküles beeinflusst wird. Eine saure Hydrolyse erhöhte die Absorption um etwa 15—25%.

Während der $E_{280/260}$ -Wert für TMV-NS sich stets gut reproduzieren ließ und praktisch mit den bekannten Angaben für Ribonucleinsäuren übereinstimmte, konnten die hohen $E_{\max/\min}$ -Werte, wie sie bei Benutzung der „detergent“-Methode angegeben worden sind, nie gefunden werden. Auch die zu Vergleichszwecken benutzte Hefe-NS lieferte deutlich kleinere Werte¹.

¹ Nach Abschluß des Manuskriptes ausgeführte Versuche mit unserem Stamm, bei denen die NS mit Hilfe von Eisessig abgetrennt worden war (FRAENKEL-CONRAT 1957), ergaben ebenfalls kleinere Werte für $E_{\max/\min}$ bei einer Messung in $\frac{m}{15}$ Puffer.

(Fortsetzung)

P-Gehalt	N-Gehalt	N/P	Referenz
		~ 1,8	eigene Werte
			LAVIN, LORING u. STANLEY 1939
		1,6—1,8	SCHUSTER, SCHRAMM u. ZILLIG 1956
			HOLDEN u. PIRIE 1955
			REDDI 1957
			KNIGHT 1957
8,1—8,5%			FRAENKEL-CONRAT, SINGER u. WILLIAMS 1957
			FRAENKEL-CONRAT u. WILLIAMS 1955
			SIEGEL, GINOZA u. WILDMAN 1957
8,36%	13,29%	1,59*	COHEN u. STANLEY 1942
8,44%	13,58%	1,61*	
			LAVIN, LORING u. STANLEY 1939
0,01—0,03%			FRAENKEL-CONRAT u. WILLIAMS 1955
			FRAENKEL-CONRAT u. SINGER 1957
			FRAENKEL-CONRAT 1957

* Diese Werte wurden aus den angegebenen Daten errechnet.

Schließlich bleiben noch die Ergebnisse der Spaltungsversuche zu erwähnen. Schon SCHRAMM u. DANNENBERG (1944) sowie DANNENBERG, SCHRAMM u. FLAMMERSFELD (1948), stellten fest, daß die nach Addition der NS- und Proteinwerte erhältliche Kurve der der reinen Absorption beinahe gleich ist. Das ist auch in unseren Versuchen der Fall. Da durch die Behandlung mit Perchlorsäure aber eine deutliche Erhöhung des Maximums der NS-Absorption eintrat, müßte der Gipfel der Additionskurve höher liegen als der der reinen Absorption. Das war auch tatsächlich in geringem Maße der Fall, jedoch hätte die erwartete Erhöhung größer ausfallen müssen.

Vielleicht könnte diesen Tatbestand eine Beobachtung von HOLDEN u. PIRIE (1955) deuten. Diese Autoren stellten eine Erniedrigung der

Absorption fest, wenn sie Harnstoff auf natives TMV einwirken ließen und dadurch die Protein-NS-Bindung im TMV beeinflussen. Das könnte darauf schließen lassen, daß intaktes TMV eine höhere Absorption besitzt, als nach der Summe der Komponenten zu erwarten wäre. Das Fehlen einer deutlichen Erhöhung der Additionskurve könnte jedoch auch einen völlig anderen Grund haben, nämlich, daß die Berechnung der Kurve der reinen Absorption für solche Vergleiche zu ungenau ist, denn eine direkte Messung der Streuung im Bereich der reinen Absorption fehlt bislang.

Zusammenfassung

Die Herstellung von TMV-Reinpräparaten wird beschrieben und die Auswertung der Meßergebnisse angegeben. Für natives TMV werden sowohl die Absorptionskurven für die gesamte und die reine Absorption, als auch Meßkurven zur Konzentrationsbestimmung des Virus in Suspensionen und Hydrolysaten gezeigt. Außerdem wird eine einfache Methode zur Bestimmung des Nucleinsäuregehaltes angegeben.

An Hand von Nucleinsäureisolierungen wird auf die Bedeutung der Vorbehandlung bzw. Alterung der Nucleinsäure für die Form der Absorptionskurven hingewiesen und die Erhöhung der ϵ_p -Werte bei hydrolytischer Spaltung behandelt. Auf Grund dieser Ergebnisse werden die Resultate der Spaltungsversuche von nativem TMV besprochen. Abschließend werden die Angaben der Literatur mit den eigenen verglichen.

Besonders danken möchte ich an dieser Stelle Fräulein H. WOLTERS für ihre Assistenz bei den Versuchen und der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung von Geräten.

Literatur

CHARGAFF, E., and ST. ZAMENHOF: The isolation of highly polymerized desoxy-pentose nucleic acid from yeast cells. *J. biol. Chem.* **173**, 327—335 (1948). — COHEN, S. S., and W. M. STANLEY: The molecular size and shape of the nucleic acid of tobacco mosaic virus. *J. biol. Chem.* **144**, 589—598 (1942). — COMMONER, B., F. L. MERCER, PH. MERRILL and A. J. ZIMMER: Microanalytical determination of the rate of tobacco mosaic virus synthesis in tobacco leaf tissue. *Arch. Biochem.* **27**, 271—286 (1950).

DANNENBERG, H., G. SCHRAMM u. H. FLAMMERSFELD: Die Ultraviolettabsorption verschiedener Stämme des Tabakmosaikvirus. *Z. Naturforsch.* **3b**, 241—245 (1948).

FRAENKEL-CONRAT, H., and R. C. WILLIAMS: Reconstitution of active tobacco mosaic virus from its inactive protein and nucleic acid components. *Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.)* **41**, 690—698 (1955). — FRAENKEL-CONRAT, H., and B. SINGER: Virus reconstitution. II. Combination of protein and nucleic acid from different strains. *Biochim. biophys. Acta* **24**, 540—548 (1957). — FRAENKEL-CONRAT, H., B. SINGER and R. C. WILLIAMS: Infectivity of viral nucleic acid. *Biochim. biophys. Acta* **25**, 87—96 (1957). — FRAENKEL-CONRAT, H.: Degradation of tobacco mosaic virus with acetic acid. *Virology* **4**, 1—4 (1957).

GINOZA, W., and D. E. ATKINSON: Comparison of some physical and chemical properties of eight strains of tobacco mosaic virus. *Virology* **1**, 253—260 (1955).

HISKEY, C. F.: Absorption spectroscopy. In: *Physical techniques in biological Research* Vol. I., p. 73—130, Acad. Press: New York 1955. — HOLDEN, M., and N. W. PIRIE: Treatments affecting the ultraviolet absorption spectrum of ribonucleic acid from three sources. *Biochim. biophys. Acta* **16**, 317—321 (1955).

KNIGHT, C. A.: Preparation of ribonucleic acid from plant viruses. *Methods in Enzymology*, III, 684—687 (1957).

LAVIN, G. J., H. S. LORING and W. M. STANLEY: Ultraviolet absorption spectra of latent mosaic and ring spot viruses and of their nucleic acid and protein components. *J. biol. Chem.* **130**, 259—268 (1939). — LOGAN, J. E., W. A. MANNELL and R. J. ROSSITER: Estimation of nucleic acids in tissue from the nervous system. *Biochem. J.* **51**, 470—482 (1952).

REDDI, K. K.: Ultraviolet absorption studies on tobacco mosaic virus. *Biochim. biophys. Acta* **24**, 238—241 (1957).

SCHRAMM, G., u. H. DANNENBERG: Über die Ultraviolettabsorption des Tabakmosaikvirus. *Ber. dtsh. chem. Ges.* **77**, 53—60 (1944). — SCHUSTER, H., G. SCHRAMM u. W. ZILLIG: Die Struktur der Ribonucleinsäure aus Tabakmosaikvirus. *Z. Naturforsch.* **11b**, 339—345 (1956). — SIEGEL, A., W. GINOZA and S. G. WILDMAN: The early events of infection with tobacco mosaic virus nucleic acid. *Virology* **3**, 554—559 (1957). — SPERRY, W. M.: Elektrophotometric microdetermination of phosphorus in lipid extracts. *Industr. Engin. Chem.*, **14**, 88—90 (1942).

TAKAHASHI, W. N.: Ultraviolet absorption as a measure of tobacco mosaic virus nucleoprotein. *Phytopathology* **41**, 142—145 (1951). — TREIBER, E., u. E. SCHAUENSTEIN: Einfluß und Berücksichtigung der Tyndall-Streuung bei der Bestimmung der konsumptiven Lichtabsorption. *Z. Naturforsch.* **4b**, 252—257 (1949). — TROXEL, A. W.: A comparison of two methods for the estimation of virus concentration. *Phytopathology* **43**, 590 (1953).

VISCHER, E., and E. CHARGAFF: The composition of the pentose nucleic acids of yeast and pancreas. *J. Biol. Chem.* **176**, 715—734 (1958).

WARBURG, O., u. W. CHRISTIAN: Isolierung und Kristallisation des Gärungsfermentes Enolase. *Biochem. Z.* **310**, 384—421 (1942). — WILLIAMS, R. C., R. C. BACKUS and R. L. STEERE: Macromolecular weights determined by direct particle counting. II. The weight of the tobacco mosaic virus particle. *J. Amer. chem. Soc.* **73**, 2062—2066 (1951).

ZECH, H., u. L. VOGT-KÖHNE: Untersuchungen zur Reproduktion des Tabakmosaikvirus. I. Elektronenmikroskopische Beobachtungen. *Exper. Cell Res.* **10**, 458—475 (1956).

(Aus der Eidg. Milchwirtschaftl. Versuchsanstalt, Liebefeld-Bern, Schweiz)

Über die Oxydation einiger organischer Säuren durch *Micrococcus rubens*

Von

A. TEMPERLI

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 31. März 1958)

Im Rahmen unserer Untersuchungen über die physiologische Bedeutung der im Käse vorkommenden Mikrokokken soll hier über die Oxydation der niederen Fettsäuren, Milchsäure und einiger Säuren aus dem Citronensäurecyclus durch ruhende Zellen von *Micrococcus rubens* berichtet werden. Über die Oxydation von Fettsäuren und Verbindungen des Citronensäurecyclus liegen zahlreiche Arbeiten vor, z. B. von ATKINSON (1956), CABELLI (1955), SAZ u. KRAMPITZ (1955), SWIM u. KRAMPITZ (1954), HOLMGREN et al. (1954), KREBS et al. (1952), STONE u. WILSON (1952), SILLIKER u. RITTENBERG (1951), AJL et al. (1951) sowie AJL (1950). Trotzdem ist man in vielen Fällen über den Mechanismus der Oxydation dieser Säuren durch Bakterien nur unvollständig orientiert.

Material und Methodik

Sämtliche Experimente wurden mit einem Stamm von *Micrococcus rubens* durchgeführt. Dieser Organismus wurde aus Emmentalerkäse isoliert¹. Die Weiterzüchtung des Stammes erfolgte bei einer Temperatur von 25° C auf Schrägagar folgender Zusammensetzung: 15 g Agar, 750 ml Bouillon² und 250 ml Pepton³. Die Kulturen wurden alle 5 Tage übergeimpft. Um das für die Warburgversuche benötigte Zellmaterial zu erhalten, wurde von den 5 Tage alten Schrägagarkulturen das Bakterienmaterial entnommen und in 100 ml sterilem Wasser suspendiert. Dazu wurde in der Regel das Material aus 5 Röhrchen entnommen. Mit 3 ml dieser Suspension wurden Fernbachkolben, welche je etwa 300 ml Bouillon enthielten, geimpft. Die beimpften Kolben wurden während 9 Tagen bei 25° C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die überstehende Bouillon abgesaugt und das Zellmaterial durch Aufschwemmen in sterilem Wasser und nachfolgendes Zentrifugieren während 12 min bei 3000 U/min zweimal gründlich gewaschen. Es erwies sich als zweckmäßig, die feuchten Zellen noch ein drittes Mal während 12 min zu zentrifugieren, um dadurch den Wassergehalt wesentlich zu vermindern. Ein Teil des Zellmaterials wurde zur Bestimmung der Trockensubstanz verwendet, während der Rest in 30 ml Pufferlösung aufgeschwemmt wurde und zur Beschickung der Warburggefäße diente. Die Bestimmung der Trockensubstanz erfolgte durch Trocknen des Bakterienmaterials

¹ Die Isolierung und Identifizierung des genannten Stammes erfolgte durch Herrn Dr. G. DOMMEN. Ich danke ihm für die Überlassung des Stammes.

² Fleischabsud aus fein zerhacktem Pferdefleisch.

³ Hergestellt durch Verdauung des ausgekochten Pferdefleisches mit Papain.

während 4 Std bei 110° C. In den meisten Fällen wurde der m/15 Phosphatpuffer nach SOERENSEN angewendet.

Die Messung der Sauerstoffaufnahme und der Kohlendioxydabgabe erfolgte nach der konventionellen direkten Methode nach WARBURG, wie sie von UMBREIT et al. (1949) beschrieben wurde. Alle Versuche wurden bei einer Temperatur von 25° C und einer Schüttelfrequenz von 100 Schwingungen je Minute durchgeführt.

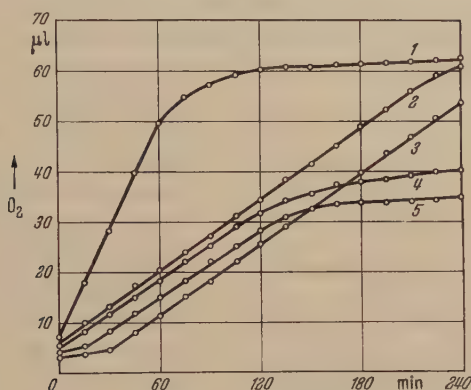


Abb. 1. Oxydation von Essigsäure. m/15 Phosphatpuffer

Nr. der Kurve	1	2	3	4	5
Essigsäurekonzentration in $\mu\text{M}/2,8 \text{ ml}$. . .	2,0	2,0	2,0	1,0	1,0
Bakterientrockensubstanz in $\text{mg}/2,8 \text{ ml}$. .	10,0	3,0	3,0	2,8	3,0
PH	6,23	6,81	6,23	6,81	6,23

Als Gasphase diente Luft. Das Flüssigkeitsvolumen in den einzelnen Kölbchen betrug immer 3,20 ml. Verwendet wurden Kölbchen mit zwei seitlichen Anhängen, deren Beschickung sich immer nach folgendem Schema richtete:

Hauptraum: 2,0 ml Bakteriensuspension in Puffer aufgeschwemmt;

Einsatz: 0,4 ml 20%ige KOH;

Seitl. Anhänge: je 0,4 ml Substrat oder Wasser.

Zur Erzielung des Temperatúrausgleiches wurden die Kölbchen während 30 min bei offenem Manometerhahn geschüttelt. Hierauf wurde der Hahn geschlossen und das Substrat zugekippt. Die Zeitspanne zwischen der ersten Ablesung zur Zeit 0 und dem Einkippen des Substrates dauerte 10 oder 15 min. Die weiteren Ablesungen erfolgten ebenfalls in den angegebenen Intervallen. Das Flüssigkeitsvolumen im Hauptraum betrug, ohne Berücksichtigung des Volumens im Einsatz, 2,8 ml und in einzelnen Fällen 2,4 ml. Die Substratkonzentrationen wurden immer auf diese Volumina bezogen. Alle angegebenen Werte sind um den Betrag der endogenen Atmung korrigiert.

Chemikalien: Verwendet wurden die analysenreinen Präparate der Firmen British Drug Houses, Eastman, Fluka, Hoffmann-La Roche, Light und Merck.

Ergebnisse und Diskussion

Aus den Kurven von Abb.1 und Abb.2 ist der Verlauf der Sauerstoffaufnahme bei der Oxydation von Essig-, Propion- und Buttersäure ersichtlich.

Aus Abb. 1 geht hervor, daß die Essigsäure sowohl bei p_H 6,23 als auch bei p_H 6,81 oxydiert wird. Berechnet man die O_2 -Aufnahme je Stunde und mg Bakterientrockensubstanz (Q_{O_2} -Wert) auf dem geradlinig verlaufenden Teil der Kurven, so beträgt diese für Kurve 1: 4,2, Kurve 2: 4,3, Kurve 3: 4,4, Kurve 4: 4,3 und Kurve 5: 4,5. Somit darf angenommen werden, daß die durch die Oxydation umgesetzte Säuremenge in diesem Bereiche weder von der Substratkonzentration noch vom p_H abhängt. Die gefundenen Q_{O_2} -Werte stehen auch mit den von SAZ u. KRAM-

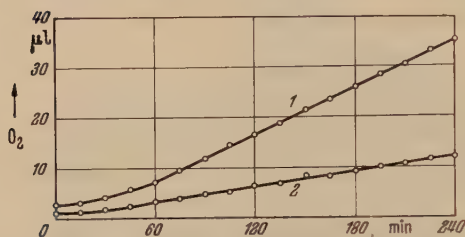


Abb. 2. Oxydation von Propion- und Buttersäure. M/15 Phosphatpuffer, p_H : 6,23. Bakterientrockensubstanz: 2,5 mg/2,8 ml. Kurve 1: 1,0 μM Propionsäure/2,8 ml. Kurve 2: 1,0 μM Buttersäure/2,8 ml

PITZ (1955) bei der Oxydation von Essigsäure durch ruhende Zellen von *Micrococcus lysodeikticus* in Übereinstimmung.

Bei der Oxydation von Propion- und Buttersäure tritt eine „lag period“ von etwa 60 min auf. Vergleicht man die O_2 -Aufnahme von Essigsäure (Abb. 1, Kurve 5) und Propionsäure (Abb. 2, Kurve 1), so findet man, daß dieselbe auf

beiden Substraten nach 240 min ungefähr gleich groß ist. Während aber nach dieser Zeitspanne bei der Essigsäure praktisch keine weitere O_2 -Aufnahme erfolgt, ist diese bei der Propionsäure noch nicht beendet. Verglichen mit der Essig- und Propionsäure wird die Buttersäure sehr schlecht oxydiert. Ähnlich wie bei der Propionsäure ist die O_2 -Aufnahme nach 4 Std noch nicht abgeschlossen. Während bei der Propionsäure der Q_{O_2} -Wert 3,6 beträgt, sinkt derselbe bei der Oxydation von Buttersäure auf 1,2. WOLIN et al. (1952) konnten nachweisen, daß *Streptococcus mitis* Buttersäure nach folgender Gleichung oxydiert:



Dabei wirkt das von einer bestimmten Konzentration an gebildete H_2O_2 hemmend auf die O_2 -Aufnahme. In unserem Falle läßt sich aber die schlechte Oxydierbarkeit der Buttersäure nicht durch diese Erscheinung erklären (siehe auch Tab. 1).

Ein Vergleich der Q_{O_2} -Werte zeigt, daß diese bei den untersuchten Fettsäuren mit zunehmender Kettenlänge absinken.

Die Oxydation von Milchsäure bei verschiedenen Konzentrationen und wechselndem p_H ist aus Abb. 3 ersichtlich. Man erkennt, daß die Milchsäure im sauren und alkalischen Bereich praktisch gleich gut oxydiert wird. Ferner ist ersichtlich, daß die Oxydation unverzüglich einsetzt und nach ungefähr 180 min die O_2 -Aufnahme beendet ist. Die totale O_2 -Aufnahme und die Substratkonzentration sind einander im Bereich von 1,0 und 2,0 μM direkt proportional (siehe Abb. 3: Kurve 5 und Kurve 2).

Der Q_{O_2} -Wert beträgt 10,2 bei p_H 6,23 und einer Substratkonzentration von $2,0 \mu M$ (Abb. 3: Kurve 2). Der Einfluß einiger Pufferzusammensetzungen auf die Veratmung der Milchsäure wurde ebenfalls untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Zusammensetzung des Puffers einen entscheidenden Einfluß ausübt. So beträgt bei einem p_H

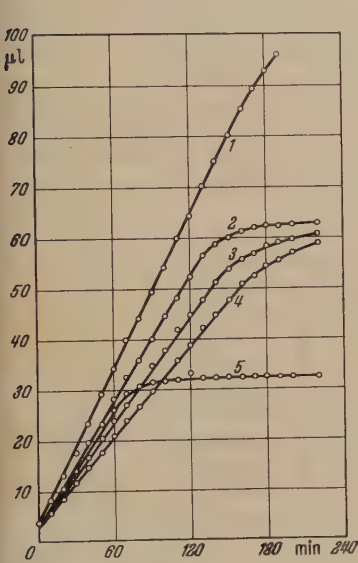


Abb. 3

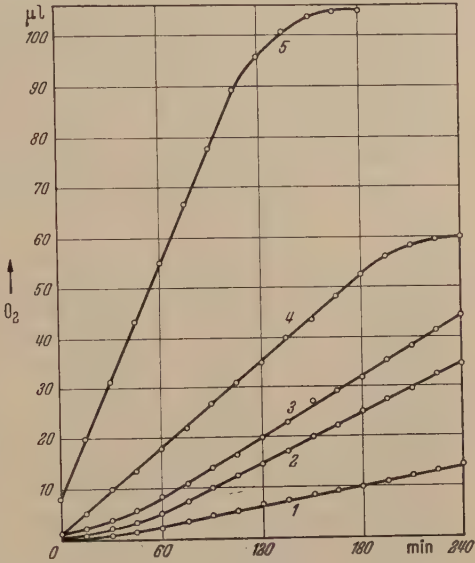


Abb. 4

Abb. 3. Oxydation von Milchsäure. M/15 Phosphatpuffer

Nr. der Kurve	1	2	3	4	5
Milchsäurekonzentration in $\mu M/2,8$ ml . .	4,0	2,0	2,0	2,0	1,0
Bakterientrockensubstanz in mg/2,8 ml . .	2,4	2,4	2,9	2,6	2,4
p_H	6,23	6,23	5,6	8,3	6,23

Abb. 4. Oxydation einiger Säuren aus dem Citronensäurecyclus. M/15 Phosphatpuffer, p_H : 6,23

Nr. der Kurve	1: Citronensäure	2: Fumarsäure	3: Bernsteinsäure	4: Brenztraubensäure	5: 1-Äpfelsäure
Substratkonzentration in $\mu M/2,8$ ml. . . .	1,0	1,0	1,0	2,0	2,0
Bakterientrockensubstanz in mg/2,8 ml . .	2,6	2,7	2,6	2,7	7,7

von 5,0 (Merck Citrat/NaOH-Puffer) und einer Milchsäurekonzentration von $2,0 \mu M/2,8$ ml die O_2 -Aufnahme nach 200 min $27,8 \mu l O_2$ gegenüber $62,2 \mu l O_2$ bei Verwendung von M/15-Phosphatpuffer bei gleichem p_H . Vergleicht man den Borat/HCl-Puffer (Merck) wiederum gegen den gleichen Phosphatpuffer bei p_H 8,0, so findet man, daß die O_2 -Aufnahme

nach 200 min 49,3 bzw. 56,0 μ l beträgt. Die Glykol- und α -Oxybuttersäure wurden bei einem p_H von 6,23 (M/15-Phosphatpuffer) nicht oxydiert.

Die O_2 -Aufnahme bei der Oxydation einiger Säuren aus dem Citronensäurecyclus ist aus Abb. 4 ersichtlich. Auffallend ist die schlechte Oxydierbarkeit der Citronensäure. Diese Erscheinung steht in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von STONE u. WILSON (1952) sowie CABELLI (1955) mit anderen Organismen. Gemäß diesen und anderen Autoren ist anzunehmen, daß die schlechte Oxydierbarkeit der Citronensäure

Tabelle 1. Oxydation einiger org. Säuren durch ruhende Zellen von *Micrococcus rubens*

Substrat	O ₂ aufgenommen ¹ $\mu\text{M O}_2/\mu\text{M Substrat}$		CO ₂ abgegeben ¹ $\mu\text{M CO}_2/\mu\text{M Substrat}$		Respiratorischer Quotient ¹		Oxydierte Substratmenge (berechnet auf Grund der O ₂ -Aufnahme) in Prozent
	ber.	gef.	ber.	gef.	ber.	gef.	
Essigsäure	2,00	1,44	2,00	1,40	1,00	0,97	72,0
Propionsäure ² . .	3,50	1,45	3,00	0,76	0,86	0,52	48,3
Buttersäure ² . .	5,00	0,54	4,00	—	0,80	—	10,8
Milchsäure	3,00	1,53	3,00	1,49	1,00	0,97	51,0
Brenztraubensäure	2,50	1,51	3,00	1,91	1,20	1,26	60,4
l-Äpfelsäure . . .	3,00	2,35	4,00	—	1,33	—	78,3
Fumarsäure ² . .	3,00	1,89	4,00	2,68	1,33	1,42	63,0
Bernsteinsäure ² .	3,50	2,08	4,00	2,26	1,14	1,08	59,4
Citronensäure ² .	4,50	0,68	6,00	—	1,33	—	15,1

M/15 Phosphatpuffer, p_H 6,23. Substratkonzentration: 2,0 μM /2,4 ml. Bakterien-trockensubstanz: etwa 6,0 mg pro Gefäß. Versuchsdauer: etwa 200 min.

¹ Die theoretischen Werte sind berechnet auf Grund der vollständigen Oxydation der Substrate zu CO_2 und H_2O .

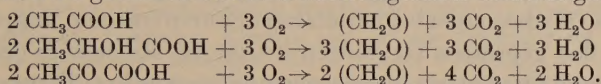
² Bei diesen Säuren ist die O_2 -Aufnahme nach 200 min noch nicht beendet.

Sämtliche Werte sind um den Betrag der endogenen Atmung korrigiert.

durch die Permeabilitätsverhältnisse der Zellwand bedingt ist. Wie aus Abb. 4 hervorgeht, findet man bei der Oxydation der Citronen-, Fumar- und Bernsteinsäure eine „lag period“, die ungefähr 60 min dauert. Die Q_{O_2} -Werte betragen für 1-Äpfelsäure 5,9, Brenztraubensäure 6,0, Bernsteinsäure 4,6, Fumarsäure 3,7 und Citronensäure 1,5. Bei der Citronen-, Fumar- und Bernsteinsäure ist die O_2 -Aufnahme nach 240 min noch nicht beendet.

Aus Tab. 1 ist von allen untersuchten Säuren die O_2 -Aufnahme und von einigen dieser Verbindungen die gebildeten CO_2 -Mengen je μM Substrat ersichtlich. Aus diesen Angaben geht klar hervor, daß keine der untersuchten Säuren vollständig oxydiert wurde. BARKER (1936), CLIFTON (1937) sowie CLIFTON u. LOGAN (1939) konnten zeigen, daß die unvollständige Oxydation am besten durch den Vorgang der oxydativen Assimilation erklärt werden kann. In unserem Falle trifft dies für die Essig-, Milch- und Brenztraubensäure zu. Unter Berücksichtigung der

experimentell gefundenen Werte (siehe Tab. 1), ist anzunehmen, daß die Oxydation der genannten Säuren nach folgenden Gleichungen verläuft:



Die oxydative Assimilierung der Essig- und Brenztraubensäure erfolgte dabei nach dem gleichem Schema, wie es von CLIFTON u. LOGAN (1939) mit *Escherichia coli* gefunden wurde. Abweichend von den Ergebnissen der Untersuchungen durch die beiden letztgenannten Autoren verläuft die oxydative Assimilation der Milchsäure.

Tabelle 2. Einfluß von 2,4 Dinitrophenol auf die Oxydation einiger organischer Säuren

Substrat	Konzentration von 2,4 DNP in $\mu\text{M}/2,8 \text{ ml}$		
	1,0	0,1	0,001
	$\mu\text{l O}_2/2,0 \mu\text{M Substrat}$		
Essigsäure	44,5 (63,9)	71,6 (62,5)	60,6 (62,5)
Propionsäure	—	49,5 (58,4)	—
Buttersäure	—	25,5 (24,5)	—
Milchsäure	—	63,4 (63,3)	—
Citronensäure	—	30,4 (23,5)	—

M/15 Phosphatpuffer, pH : 6,23. Bakterientrockensubstanz: etwa 6,0 mg je Gefäß. Versuchsdauer: etwa 200 min. Werte in (): O_2 -Aufnahme ohne 2,4 DNP. Sämtliche Werte sind um den Betrag der endogenen Atmung korrigiert.

Das 2,4 DNP und das Substrat wurden zu Beginn, gleichzeitig der Bakterien-suspension, zugesetzt.

In Anlehnung an die Arbeit von CLIFTON u. LOGAN (1939) wurden noch einige Experimente durchgeführt, bei denen durch Zugabe von 2,4 Dinitrophenol (2,4 DNP) versucht wurde, die oxydative Assimilation zu blockieren. Die Ergebnisse sind in Tab. 2 zusammengestellt. Es ist ersichtlich, daß in Gegenwart von $0,1 \mu\text{M}$ 2,4 DNP die O_2 -Aufnahme bei der Essigsäure eindeutig erhöht wird. Dieses Ergebnis ist somit eine weitere Stütze für die Annahme, daß die Essigsäure oxydativ assimiliert wird. Da die Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ 2,4 DNP offenbar nicht für alle Säuren die kritische Menge, bei welcher die oxydative Assimilierung gehemmt wird, darstellt, läßt sich für die andern Säuren in dieser Hinsicht nichts aussagen. In allen Fällen konnte beobachtet werden, daß bei einer Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ 2,4 DNP keine Stimulierung der endogenen O_2 -Aufnahme eintrat. Dagegen fanden MOSES u. SYRETT (1955), daß bereits $0,06 \text{ mM}$ 2,4 DNP die Eigenatmung von Bäckerhefe zu steigern vermochte.

Zusammenfassung

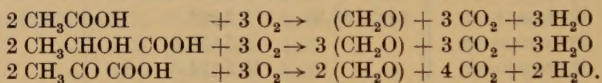
Es wurde die Oxydation einiger organischer Säuren durch ruhende Zellen von *Micrococcus rubens* mit Hilfe der manometrischen Methode nach WARBURG untersucht. Folgende Ergebnisse wurden gefunden:

1. Von den niederen Fettsäuren wurden Essig-, Propion- und Buttersäure oxydiert. Dabei sinkt der Q_{O_2} -Wert in der angegebenen Reihenfolge. Zu Beginn der Oxydation der beiden letzteren Säuren trat eine „lag period“ auf.

2. Von den geprüften Oxyssäuren wurde die Milchsäure deutlich, die Glykol- und α -Oxybuttersäure dagegen nicht oxydiert. Ferner wurde der Einfluß verschiedener Puffergemische auf die O_2 -Aufnahme untersucht.

3. Mit Verbindungen des Citronensäurecyclus ergab sich, daß Citronensäure sehr schlecht, Brenztrauben-, Fumar-, Bernstein- und 1-Äpfelsäure dagegen gut oxydiert wurden.

4. Auf Grund der gemessenen O_2 - und CO_2 -Umsetzungen geht hervor, daß alle untersuchten Säuren unvollständig oxydiert wurden. Diese Erscheinung muß, wie auch Hemmversuche mit 2,4 DNP zeigen, bei einzelnen Säuren auf die oxydative Assimilation zurückgeführt werden. Demgemäß drängt sich folgende Formulierung der Oxydation der Essig-, Milch- und Brenztraubensäure auf:



Herrn Prof. Dr. P. KÄSTLI, Vorstand der genannten Versuchsanstalt, danke ich für das große Interesse und Verständnis, das er meiner Arbeit entgegenbrachte.

Literatur

- ATKINSON, D. E.: The oxidation of ethanol and tricarboxylic acid cycle intermediates by *Acetobacter peroxydans*. *J. Bact.* **72**, 195 (1956). — AJL, S. J., L. S. RANSON and D. T. O. WONG: Studies on the mechanism of acetate oxidation by *Micrococcus lysodeikticus*. *J. biol. Chem.* **184**, 849 (1951). — AJL, S. J.: Acetic acid oxidation by *Escherichia coli* and *Aerobacter aerogenes*. *J. Bact.* **59**, 499 (1950). — BARKER, H. A.: The oxidative metabolism of the colorless alga, *Prototheca zopfii*. *J. cell. comp. Physiol.* **8**, 231 (1936). — CABELLI, V. J.: The tricarboxylic acid cycle in the oxidative and synthetic metabolism of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Bact.* **70**, 23 (1955). — CLIFTON, C. E., and W. A. LOGAN: On the relation between assimilation and respiration in suspensions and in cultures of *Escherichia coli*. *J. Bact.* **37**, 523 (1939). — CLIFTON, C. E.: On the possibility of preventing assimilation in respiring cells. *Enzymologia* **4**, 246 (1937). — HOLMGREN, N. B., I. MILLMAN and G. P. YOUNG: Studies on the metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bact.* **68**, 405 (1954). — KREBS, H. A., S. GURIN and L. V. EGGLESTON: The pathway of oxidation of acetate in baker's yeast. *Biochem. J. (London)* **51**, 614 (1952). — MOSES, V., and P. J. SYRETT: The endogenous respiration of microorganisms. *J. Bact.* **70**, 201 (1955). — SAZ, H. J., and L. O. KRAMPITZ: The oxidation of acetate by extracts of *Micrococcus lysodeikticus*. *J. Bact.* **69**, 288 (1955). — SILLIKER, J. H., and S. C. RITTENBERG: Studies on the aerobic oxidation of fatty acids by bacteria. *J. Bact.* **61**, 653 (1951). — STONE, R. W., and P. W. WILSON: Respiratory activity of cell-free extracts from *Azotobacter*. *J. Bact.* **63**, 605 (1952). — SWIM, H. E., and L. O. KRAMPITZ: Acetic acid oxidation by *Escherichia coli*: Evidence for the occurrence of the tricarboxylic acid cycle. *J. Bact.* **67**, 419 (1954). — UMBREIT, W. W., R. H. BURRIS and J. F. STAUFFER: Manometric techniques and tissue metabolism. Minneapolis, Minn.: Burgess (1949). — WOLIN, M. J., J. B. EVANS and C. F. NIVEN, jr.: Oxidation of butyric acid by *Streptococcus mitis*. *J. Bact.* **64**, 531 (1952).

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten, Kliniken usw. ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photos. Vorlagen für Diagramme sind in etwa doppelter Reproduktionsgröße erwünscht.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Selbständige kritische Sammelreferate über einzelne Gebiete sind erwünscht.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinn der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Pathologisch-histologisches Praktikum

Von Professor Dr. **Herwig Hamperl**, Direktor des Pathologischen Institutes der Universität Bonn. Fünfte Auflage. Mit 185 Abbildungen, davon 9 farbige auf 2 Tafeln. VIII, 260 Seiten 8°. 1958. Steif geheftet DM 12,60

Inhaltsübersicht: Einleitung. — Blut. — Herz. — Gefäße. — Leber. — Niere. — Respirationstrakt, Lunge. — Milz. — Zentralnervensystem. — Magen-Darm-Trakt. — Knochensystem. — Drüsen. — Geschlechtsorgane. — Lymphatischer Apparat. — Skelettmuskulatur. — Spezifische Entzündungen. — Tierische Parasiten. — Gutartige Tumoren des Binde- und Stützgewebes. — Bösartige Tumoren des Binde- und Stützgewebes. — Gutartige epitheliale Tumoren. — Bösartige epitheliale Tumoren (Carcinome, Krebse). — Verschiedene Tumoren. — Anhang: Zusammenstellung einiger Präparate nach Gesichtspunkten der allgemeinen Pathologie. — Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Genetisches und Cytogenetisches Wörterbuch

Von Dr.-agr. **R. Rieger** und Dipl.-agr. **A. Michaelis**, Institut für Kulturpflanzenforschung Gatersleben der Deutschen Akademie der Wissenschaften zu Berlin.
Zweite, erweiterte Auflage. Mit 149 Abbildungen. IV, 648 Seiten 8°. 1958.

Ganzleinen DM 49,60

Aus dem Vorwort:

... Das Wörterbuch umfaßt in der 2. Auflage ca. 4000 Termini und 1500 Literaturangaben.

Die Anzahl der genetisch-cytogenetischen Stichwörter hat im Laufe der letzten Jahre besonders durch die starke Weiterentwicklung der Genetik der Mikroorganismen und das weitere Vordringen der Elektronenmikroskopie stark zugenommen. Gleichzeitig geht die Spezialisierung im Fachgebiet der Genetik mit seinen verschiedenen Forschungsrichtungen sehr schnell voran und erschwert selbst dem Fachgenetiker einen fundierten Überblick. Diese rapide Fortentwicklung spiegelt sich außer in der Prägung einer großen Anzahl neuer Termini auch in der Erweiterung oder Wandlung des Inhaltes bereits gebräuchlicher Begriffe wider und hat naturgemäß ihren Niederschlag in dieser 2. Auflage des Wörterbuches gefunden ...

Wie in der 1. Auflage handelt es sich nicht nur um die Sammlung und alphabetische Anordnung möglichst vieler ganz knapp definierter Stichworte, sondern es wurde in all den Fällen, deren Bedeutung diese Verfahrensweise gerechtfertigt erscheinen ließ, eine kurze zusammenfassende Darstellung der wesentlichsten Punkte zum Stichwortinhalt an die vorangestellte knappe Definition angeschlossen, so daß es sich nicht mehr um ein Wörterbuch im engeren Sinne, sondern um eine Verbindung zwischen einem solchen und einer Enzyklopädie handelt ...

Um dem Genetischen und Cytogenetischen Wörterbuch gleichzeitig den Wert eines deutsch-englischen/englisch-deutschen Vokabulariums der Fachsprache zu geben, wurde den deutschen Termini dort, wo die englische Sprache andere Ausdrücke verwendet, die englische Stichwortübersetzung am Schluß des jeweiligen Stichwortes in Klammern beigelegt ...

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG